

**INTERACCIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE CARBONO  
O METÁLICAS CON (BIO)MOLECÚLAS  
Y SU APLICACIÓN AL DESARROLLO DE SENSORES**

---

IRIA BRAVO SEGURA  
MADRID, 2017



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL**



# **Interacción de nanoestructuras de carbono o metálicas con (bio)moléculas y su aplicación al desarrollo de sensores**

**Iria Bravo Segura**

Tesis Doctoral

Madrid, Octubre de 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL**



# **Interacción de nanoestructuras de carbono o metálicas con (bio)moléculas y su aplicación al desarrollo de sensores**

Memoria que presenta la licenciada

**Iria Bravo Segura**

para optar al grado de Doctor

Dña. María Encarnación Lorenzo Abad, Doctora en Ciencias Químicas y Catedrática del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, y D. Félix Pariente Alonso, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor Titular del mismo departamento:

Informamos que la presente memoria, titulada: “Interacción de nanoestructuras de carbono o metálicas con (bio)moléculas y su aplicación del desarrollo de sensores” ha sido desarrollada por Dña. Iria Bravo Segura en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo nuestra dirección.

Asimismo, hacemos constar que el trabajo descrito en dicha memoria reúne, en nuestra opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que, como directores del trabajo de investigación, autorizamos su presentación para que pueda ser defendida por el doctorando como Tesis Doctoral en acto público en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste firmamos el presente documento en Madrid, a 11 de septiembre de 2017.

Fdo. M<sup>a</sup> Encarnación Lorenzo Abad

Fdo. Félix Pariente Alonso

# Agradecimientos

---

Me gustaría agradecer en estas líneas a todas las personas que me han ayudado a llevar a cabo este trabajo.

A mis directores de tesis, Dra. Encarnación Lorenzo y Dr. Félix Pariente, cuya colaboración ha sido vital en el desarrollo de este trabajo. Me han aportado sus conocimientos y experiencia, además de su apoyo y paciencia, y me han abierto las puertas del mundo de la investigación.

Al Ministerio de Economía y Competitividad por la oportunidad de disfrutar de una beca FPI para la realización de esta tesis, a la empresa Digna Biotech por la financiación de un contrato de investigación y al Ministerio de Educación por la concesión de una beca de colaboración.

A Mónica y Tania, por todo lo que me habéis ayudado, los consejos, la experiencia y la paciencia infinita. También a José María Abad por orientarme en muchos momentos.

A mis compañeros y amigos científicos, César, Emiliano, María y Marta, por los buenos ratos y las risas, además de vuestro apoyo en todo momento.

A mis amigos, tanto de Vigo como de Madrid, por todos los momentos compartidos y por animarme siempre a seguir adelante.

A mi familia, a la de siempre y a la nueva, por el apoyo incondicional y la confianza. Especialmente, quiero agradecer a mis padres absolutamente todo. No sería capaz de enumerar todas las cosas por las que os estoy agradecida.

A Marki, muchas gracias por tu apoyo, tu cariño, tu confianza absoluta y por darme un empujón cuando me faltan las fuerzas. Gracias por hacer siempre que me sienta bien.

## Índice

---

---

<b>RESUMEN / ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
Resumen .....	3
Abstract.....	7
 <b>INTRODUCCIÓN .....</b>	 <b>11</b>
I.1. Electrodos modificados químicamente. Sensores electroquímicos .....	13
I.1.1 Métodos de modificación de electrodos.....	14
I.2. Electrodos modificados con nanomateriales .....	20
I.2.1 Nanopartículas de oro .....	25
I.2.2 Grafeno.....	30
I.2.3 Nanotubos de carbono .....	34
I.2.4 Nanopuntos de carbono .....	37
I.2.5 Funcionalización de nanomateriales de carbono .....	40
I.3. Electrodos modificados con biomoléculas. Biosensores.....	43
I.3.1 Biosensores enzimáticos.....	44
I.3.2 Biosensores electroquímicos de ADN .....	48
I.4 Aplicación analítica de los electrodos modificados .....	54
 <b>OBJETIVOS .....</b>	 <b>59</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	 <b>63</b>
M.1. Reactivos, disoluciones y dispersiones .....	65
M.1.1 Reactivos Comerciales .....	65
M.1.2 Reactivos sintetizados.....	66
M.1.3 Disoluciones .....	66
M.1.4 Dispersiones .....	68
M.1.5 Muestras reales .....	68
M.1.6 Ácidos desoxirribonucleicos (ADN) .....	69
M.2. Instrumentación .....	72
M.2.1 Espectrofotómetro.....	72
M.2.2 Espectrofluorímetro.....	72
M.2.3 Potenciostato .....	72
M.2.4 Microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	72



M.2.5 Microscopio de fuerzas atómicas (AFM).....	73
M.2.6 Espectrófotometro FTIR .....	73
M.2.7 Microscopio electrónico de transmisión (TEM) .....	73
M.2.8 Espectrómetro Raman .....	74
M.2.9 Instrumentación para dispersión de luz dinámica (DLS) .....	74
M.2.10 Instrumentación para medida del potencial Zeta .....	74
M.2.11 Instrumentación para análisis elemental.....	74
M.3. Procedimientos experimentales .....	75
M.3.1 Pretratamiento de los electrodos .....	75
M.3.2 Modificación de electrodos con nanotubos de carbono .....	75
M.3.3 Modificación de las plataformas basadas en MWCNTs con 3,4-DHS.....	77
M.3.4 Síntesis de grafeno reducido con 3,4-DHS.....	77
M.3.5 Reducción de grafeno oxidado con borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) .....	77
M.3.6 Reducción de grafeno oxidado con hidrazina .....	77
M.3.7 Modificación de electrodos con grafeno reducido químicamente .....	78
M.3.8 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando 3,4-DHS como reductor.....	78
M.3.9 Determinación del tamaño de las nanopartículas de oro .....	78
M.3.10 Modificación de electrodos con AuNPs-DHS.....	78
M.3.11 Preparación del biosensor de lactato.....	79
M.3.12 Determinación de lactato mediante el kit enzimático .....	79
M.3.13 Estimación de la concentración de CNDs.....	79
M.3.14 Modificación de electrodos con CNDs .....	80
M.3.15 Inmovilización de ADN sobre los electrodos nanoestructurados.....	80
M.3.16 Preparación del biosensor de ADN .....	80
M.3.17 Desnaturalización de las muestras de ADN de PCR .....	80
M.3.18 Hibridación de ADN en el biosensor .....	80
M.3.19 Detección del evento de hibridación en el biosensor de ADN .....	81
M.3.20 Determinación de la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) .....	81
M.4. Cálculo de parámetros y constantes de interés .....	81
M.4.1 Determinación del área del electrodo electroquímicamente activa .....	81
M.4.2 Recubrimiento superficial del material depositado sobre la superficie del electrodo .....	82

M.4.3 Constante heterogénea de transferencia de carga. Especies inmovilizadas sobre la superficie del electrodo .....	82
M.4.4 Constante catalítica mediante el método de Galus .....	83
M.4.5 Coeficiente de difusión .....	83
M.4.6 Deconvolución de bandas .....	84
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1. Plataformas electrocatalíticas basadas en nanotubos de carbono y en la química de las sales de diazonio .....</b>	<b>89</b>
1.1 Inmovilización de los MWCNTs sobre los electrodos .....	90
1.1.1 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 1 .....	90
1.1.2 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 2 .....	93
1.1.3 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 3 .....	95
1.1.4 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 4 .....	95
1.1.5 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 5 .....	96
1.2 Caracterización de los electrodos nanoestructurados con nanotubos de carbono .....	96
1.2.1 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	97
1.2.2 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM) .....	99
1.2.3 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante voltamperometría cíclica .....	102
1.3 Modificación con 3,4-DHS de las plataformas basadas en MWCNTs .....	105
1.3.1 Modificación de AuSPEs con 3,4-DHS.....	107
1.3.2 Modificación de CSPEs con 3,4-DHS.....	111
1.4 Propiedades electrocatalíticas de las plataformas SPE/MWCNTs/ 3,4-DHS .....	113
1.4.1 Oxidación electrocatalítica de NADH.....	114
1.4.2 Oxidación electrocatalítica de hidrazina.....	123

## CAPÍTULO 2

<b>2. Reducción y modificación química de grafeno en un solo paso para el desarrollo de plataformas (bio)electrocatalíticas .....</b>	<b>131</b>
2.1 Interacción de óxido de grafeno con 3,4-DHS .....	132
2.2 Reducción de óxido de grafeno con 3,4-DHS .....	134
2.2.1 Efecto de la concentración de 3,4-DHS en la reducción de óxido de grafeno .....	135
2.2.2 Efecto del tiempo de reacción en la reducción de óxido de grafeno con 3,4-DHS .....	137
2.3 Caracterización del material sintetizado .....	138
2.3.1 Caracterización de rGO-DHS mediante espectrofotometría de absorción y emisión .....	138
2.3.2 Caracterización de rGO-DHS mediante espectroscopía Raman .....	140
2.4 Desarrollo de electrodos modificados con rGO-DHS .....	143
2.4.1 Caracterización de los electrodos nanoestructurados con rGO-DHS mediante voltamperometría cíclica .....	143
2.4.2 Caracterización de los electrodos modificados con grafeno mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) .....	147
2.5 Aplicaciones analíticas de los electrodos modificados desarrollados .....	151
2.5.1 Oxidación electrocatalítica de hidrazina .....	151
2.5.2 Desarrollo de un biosensor de lactato .....	159

## CAPÍTULO 3

<b>3. Síntesis de nanopartículas de oro con 3,4-DHS .....</b>	<b>171</b>
3.1 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando 3,4-DHS como reductor .....	171
3.1.1 Efecto de la relación molar de $\text{HAuCl}_4$ y 3,4-DHS .....	173
3.1.2 Efecto del pH en la síntesis de nanopartículas de oro .....	175
3.1.3 Influencia de la temperatura .....	176
3.1.4 Estudio cinético de la formación de las nanopartículas de oro .....	177
3.2 Caracterización de las nanopartículas sintetizadas .....	179
3.2.1 Caracterización mediante espectrofotometría .....	179
3.2.2 Caracterización mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR) .....	181

3.2.3 Caracterización mediante espectroscopía Raman .....	182
3.2.4 Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	186
3.3 Propiedades electrocatalíticas de las plataformas CSPEs/AuNPs-DHS .....	186
3.3.1 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante voltamperometría cíclica .....	187
3.3.2 Oxidación electrocatalítica de hidrazina.....	190
3.3.3 Oxidación electrocatalítica de peróxido de hidrógeno.....	198
3.4 Desarrollo de un biosensor de lactato .....	204
3.4.1 Desarrollo y respuesta del biosensor.....	205
3.4.2 Respuesta del biosensor.....	210
3.4.3 Estudio de sustancias potencialmente interferentes .....	212
3.4.4 Determinación directa de lactato en muestras reales .....	212

## CAPÍTULO 4

<b>4. Nanopuntos de carbono para la detección de mutaciones genéticas.....</b>	<b>217</b>
4.1 Síntesis y caracterización de los nanopuntos de carbono .....	217
4.1.1 Caracterización mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR) .....	218
4.1.2 Caracterización mediante dispersión de luz dinámica (DLS) .....	219
4.1.3 Caracterización mediante análisis elemental.....	220
4.1.4 Caracterización mediante potencial Zeta.....	221
4.1.5 Caracterización mediante TEM .....	221
4.1.6 Caracterización mediante espectroscopía Raman .....	222
4.1.7 Caracterización mediante espectrofotometría .....	223
4.2 Interacción de los nanopuntos de carbono con ADN.....	225
4.2.1 Estudio de la interacción de los CDs con ADN mediante espectrofotometría de emisión de fluorescencia .....	226
4.2.2 Estudio de la temperatura de desnaturalización .....	228
4.3 Nanoestructuración del electrodo.....	229
4.3.1 Caracterización morfológica de la superficie nanoestructurada mediante SEM.....	229

4.3.2 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante voltamperometría cíclica .....	230
4.4 Aplicaciones analíticas de los AuSPE nanoestructurados con CDs .....	233
4.5 Desarrollo de un biosensor nanoestructurado de ADN.....	237
4.5.1 Detección de secuencias de <i>Helicobacter pylori</i> .....	237
4.5.2 Detección de mutaciones genéticas asociadas a la fibrosis quística.....	249
<b>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS .....</b>	<b>253</b>
Conclusiones .....	255
Conclusions .....	257
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>259</b>
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>301</b>

Resumen

Abstract

---

## Resumen

El objetivo principal de este trabajo de tesis es el uso de nanomateriales para la modificación de electrodos con la finalidad de desarrollar sensores y biosensores electroquímicos sensibles y robustos. Para ello se han utilizado diferentes nanomateriales, que pueden estar funcionalizados o no, y son: nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de oro y nanopuntos de carbono.

Se estudiaron diferentes estrategias de modificación de la superficie de electrodos serigrafiados de oro y de carbono con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs). La estrategia 1 consistió en la diazotación y electroinjerto de MWCNTs aminados sobre electrodos de oro y carbono. Para las estrategias 2, 3 y 4 se modificó la superficie de oro con 4-aminotiofenol, de manera que queden grupos amino expuestos hacia la disolución. Estos grupos amino se sometieron al proceso de diazotación en las estrategias 2 y 3 y, a continuación, se electroinjertaron sobre MWCNTs no modificados (estrategia 2) o se hicieron reaccionar con MWCNTs aminados formando un enlace triazeno (estrategia 3). La estrategia 4 se basó en la formación de un enlace entre amida con MWCNTs carboxilados. Por último, a modo de comparación, se estudió como estrategia 5 la adsorción directa de los MWCNTs sobre la superficie de los electrodos serigrafiados de oro y carbono. Las superficies se caracterizaron mediante SEM, AFM y voltamperometría cíclica. Posteriormente, con el objeto de mejorar sus propiedades electrocatalíticas, los electrodos nanoestructurados se modificaron con N,N-bis(3,4-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHS) por adsorción directa. Se estudió la actividad electrocatalítica frente a la oxidación de NADH e hidrazina, concluyéndose que los mejores resultados se obtienen con las plataformas desarrolladas siguiendo la estrategia 1 en presencia de 3,4-DHS. Por tanto, estas plataformas se utilizaron para desarrollar dos sensores, uno de NADH, para lo que se emplearon electrodos serigrafiados de oro y otro de hidrazina, para lo que se utilizaron electrodos serigrafiados de carbono. Se obtuvieron buenos resultados para ambos analitos, con unos límites de detección de 3.4 y 6.0  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

El 3,4-DHS también se empleó con una doble función, reductor y funcionalizador, en la reducción de óxido de grafeno (GO) para producir directamente grafeno modificado

químicamente (rGO-DHS) mediante un tratamiento térmico. El material resultante se caracterizó mediante diferentes técnicas, confirmando, por un lado, la reducción del GO y, por otro, la presencia del 3,4-DHS en su superficie. Se modificaron electrodos serigrafiados de carbono con rGO-DHS y se caracterizaron mediante técnicas electroquímicas, observándose un comportamiento diferente al comparar con electrodos modificados con GO. Concretamente, los electrodos modificados con rGO-DHS presentan una menor resistencia a la transferencia de carga. Además, los electrodos modificados con rGO-DHS presentan propiedades electrocatalíticas frente a la oxidación de hidrazina, lo que se utilizó como base para el desarrollo de un sensor para la determinación de este analito. Se obtuvieron buenas propiedades analíticas, con un límite de detección de 0.20  $\mu\text{M}$ .

También se han empleado estos electrodos para la construcción de un biosensor amperométrico de lactato tras modificar la superficie nanoestructurada con la enzima lactato oxidasa (LOx). El 3,4-DHS que se encuentra adsorbido sobre la superficie del grafeno contiene grupos quinona y puede actuar como un mediador redox, aceptando los electrones involucrados en la oxidación enzimática de lactato. De esta manera, es posible reducir el sobrepotencial y evitar los problemas derivados de la presencia de sustancias potencialmente interferentes. De hecho, el estudio de la influencia de estas sustancias sobre la respuesta del biosensor reveló que su presencia no afecta significativamente, incluso cuando se encuentran en concentración igual al analito, excepto en el caso del ácido ascórbico. El biosensor desarrollado se empleó en la determinación directa de lactato en muestras reales de vino blanco, sin necesidad de procesos de separación previa, únicamente fue necesario realizar una dilución de la muestra.

De manera similar al caso de GO, se utilizó el 3,4-DHS como reductor en la síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas (AuNPs-DHS) a partir de una sal. En este caso, la reacción transcurrió a temperatura ambiente. La molécula de 3,4-DHS actúa, además de como reductor, como estabilizante, permitiendo la formación de una suspensión coloidal estable mediante una reacción de un único paso. Se optimizaron los parámetros de síntesis, tales como concentración, pH o temperatura y las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron mediante diferentes técnicas. Esto



permitió confirmar que las nanopartículas tienen un tamaño medio de  $33 \pm 3$  nm y que se encuentran rodeadas por moléculas de 3,4-DHS unidas al oro a través de los grupos fenolato y que alrededor de ellas se forma una capa de moléculas de 3,4-DHS en su forma oxidada.

Cuando las nanoestructuras AuNPs-DHS se depositan sobre electrodos serigrafiados de carbono presentan actividad electrocatalítica frente a la oxidación de hidrazina y la oxidación y reducción de peróxido de hidrógeno. Los sensores desarrollados para ambos analitos presentan unas propiedades analíticas excelentes, obteniéndose unos límites de detección de 22 nM, 0.15  $\mu$ M y 0.32  $\mu$ M para la oxidación de hidrazina y oxidación y reducción de peróxido, respectivamente, además de unos intervalos lineales muy amplios y una buena reproducibilidad.

Además, se construyó un biosensor de lactato modificando los electrodos nanoestructurados con AuNPs-DHS con la enzima LOx. A diferencia del biosensor desarrollado con rGO-DHS, en este caso, la determinación de lactato se realiza a través de la cuantificación del peróxido generado enzimáticamente, cuya oxidación está catalizada por las AuNPs-DHS. El biosensor desarrollado presenta un límite de detección de 2.6  $\mu$ M, una buena reproducibilidad y una elevada selectividad. Este biosensor se aplicó en la determinación de lactato directamente en muestras reales de vino blanco, cerveza y yogur, con una dilución como único tratamiento de muestra. Se obtuvieron recuperaciones cercanas al 100% al comparar los resultados con los obtenidos con un kit enzimático comercial.

Por otro lado se sintetizaron nanopuntos de carbono (CDs) mediante la carbonización térmica de dos moléculas orgánicas sencillas, EGTA y Tris. La caracterización mediante diferentes técnicas permitió determinar que los CDs sintetizados tienen un tamaño medio de  $3.4 \pm 0.5$  nm y que presentan grupos amida y alcohol. Se estudió la interacción de los CDs con ADN, observándose que la presencia de este provoca una amortiguación de la fluorescencia de los CDs. Se modificaron electrodos serigrafiados de oro con los CDs y se caracterizaron. Estos electrodos nanoestructurados se modificaron con una sonda de ADN no modificada de 25 bases correspondiente a la bacteria *Helicobacter pylori*. Tras su incubación con una secuencia complementaria o no complementaria se acumuló el indicador electroquímico, safranina, mediante la

aplicación de barridos sucesivos de potencial. La señal obtenida para el electrodo modificado con la sonda e incubado con la secuencia complementaria fue mucho mayor que la obtenida para la secuencia no complementaria, demostrando que los electrodos nanoestructurados sirven como plataforma para la inmovilización de sondas de ADN no modificadas que mantienen su capacidad de reconocimiento. Además, cuando la sonda se hibrida con una secuencia que contiene una sola base no complementaria, la señal es menor que para la complementaria y mayor que para la no complementaria, por lo que se puede afirmar que el biosensor desarrollado es capaz de detectar mutaciones puntuales en una secuencia de 25 bases. El biosensor de ADN desarrollado se aplicó a la detección de mutaciones asociadas a la fibrosis quística en ADN real de PCR extraído de células sanguíneas. Para ello, se modificó el electrodo nanoestructurado con una sonda de ADN de 100 bases complementaria a un fragmento de 373 bases del exón 11 del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Esta sonda se incubó con una secuencia complementaria, correspondiente a pacientes sanos, y con una secuencia que contiene una mutación consistente en la delección de tres nucleótidos, que es la causante de la enfermedad en la mayoría de los casos. La señal obtenida tras la acumulación de la safranina fue aproximadamente el doble para la secuencia complementaria que para la mutada, confirmando que el biosensor desarrollado es capaz de diferenciar entre secuencias que porten o no la mutación. Es decir, permite diferenciar entre pacientes sanos y enfermos, por lo que puede ser utilizado como método de cribado en la detección de enfermedades asociadas a mutaciones genéticas.

**Abstract**

The main objective of this thesis work is the use of nanomaterials for the modification of electrodes with the aim of developing sensitive and robust electrochemical sensors and biosensors. Different nanomaterials, which can be functionalized or not, have been used in order to achieve this goal. These include carbon nanotubes, graphene, gold nanoparticles and carbon nanodots.

Different strategies were studied for the modification of gold and carbon screen printed electrodes surfaces with multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs). Strategy 1 was based in the diazotization and electrografting of aminated MWCNTs onto carbon and gold electrodes. For the strategies 2, 3 and 4 the gold surface was modified with 4-aminothiophenol, leaving the amino groups exposed to the solution. These amino groups were diazotized in strategies 2 and 3 and they were subsequently electrografted onto non modified MWCNTs (strategy 2) or reacted with aminated MWCNTs thus forming a triazene bond (strategy 3). Strategy 4 was based on the formation of an amide bond with carboxylated MWCNTs. Finally, by way of comparison, strategy 5 was studied, which consists of the MWCNTs direct adsorption onto the gold and carbon screen printed electrodes surface. These modified surfaces were characterized by SEM, AFM and cyclic voltammetry. Afterwards, with the purpose of improving their electrocatalytic properties, the nanostructured electrodes were modified with N,N-bis(3,4-dihydroxybenzylidene)-1,2-diaminobenzene (3,4-DHS) by direct adsorption. The electrocatalytic activity was studied towards NADH and hydrazine oxidation. The best results were obtained with the platforms developed following strategy 1 in the presence of 3,4-DHS. Therefore, these platforms were used to develop two sensors, a NADH one, using gold screen printed electrodes and a hydrazine one, using carbon screen printed electrodes. Good results were obtained for both analytes, with detection limits of 3.4 and 6.0  $\mu\text{M}$ , respectively.

3,4-DHS was also employed with a double function, reductant and functionalizer, in the reduction of graphene oxide (GO) to produce directly chemically modified graphene (rGO-DHS) by a thermal treatment. The resulting material was characterized by different techniques, confirming, on one hand, the GO reduction and, on the other hand, the presence of 3,4-DHS on its surface. Carbon screen printed

electrodes were modified with rGO-DHS and characterized by electrochemical techniques. A different behavior was observed when compared to GO modified electrodes, in particular, rGO-DHS modified electrodes showed a smaller charge transfer resistance. Moreover, rGO-DHS modified electrodes exhibit electrocatalytic properties towards hydrazine oxidation, which was used for the development of a sensor for this analyte determination. Good analytical properties were obtained, with a detection limit of 0.20  $\mu\text{M}$ .

These electrodes were also used for the construction of an amperometric biosensor for lactate determination after modifying the nanostructured surface with the enzyme lactate oxidase (LOx). The 3,4-DHS adsorbed onto the graphene surface contains quinone groups and can act as a redox mediator, accepting the electrons involved in the lactate enzymatic reaction. This way, the overpotential can be reduced and issues derived from the presence of potential interfering substances can be avoided. In fact, the study of these substances influence over the biosensor response revealed that their presence does not affect significantly, even when they match the analyte concentration, except in the case of ascorbic acid. The developed biosensor was employed in the direct lactate determination in white wine real samples, without the need of previous separation processes, only a sample dilution was necessary.

In a similar way to the case of GO, 3,4-DHS was used as a reductant in the functionalized gold nanoparticles (AuNPs-DHS) synthesis from a salt. In this case, the reaction occurred at room temperature. The 3,4-DHS molecule acts, not only as a reductant, but also as a stabilizer in the formation of a stable colloidal suspension in a one-step reaction. Synthesis parameters, such as concentration, pH or temperature, were optimized and the synthesized nanoparticles were characterized by different techniques. This confirmed that the nanoparticles have a mean diameter of  $33 \pm 3$  nm and that they are surrounded by 3,4-DHS molecules bonded to the gold through the phenolate groups and that an outer layer is formed composed of 3,4-DHS molecules in their oxidized form.

When the AuNPs-DHS nanostructures are deposited onto carbon screen printed electrodes they show electrocatalytic activity towards hydrazine oxidation and hydrogen peroxide oxidation and reduction. The developed sensors for both analytes

show excellent analytical properties. Detection limits of 22 nM, 0.15  $\mu$ M and 0.32  $\mu$ M were obtained for hydrazine oxidation and hydrogen peroxide oxidation and reduction, respectively, as well as wide linear ranges and a good reproducibility.

In addition, a lactate biosensor was developed by modification of AuNPs-DHS nanostructured electrodes with the enzyme LOx. As opposed to the biosensor developed using rGO-DHS, in this case, lactate determination was carried out by measuring the enzymatically generated peroxide, whose oxidation is catalyzed by AuNPs-DHS. The developed biosensor shows a detection limit of 2.6  $\mu$ M, a good reproducibility and a high selectivity. This biosensor was applied to the direct lactate determination in white wine, beer and yoghurt real samples, with a dilution as the only sample treatment. Recoveries near 100% were obtained when the results were compared to the ones obtained using a commercial enzymatic kit.

Furthermore, carbon nanodots (CDs) were synthesized by thermal carbonization of two simple organic molecules, EGTA and Tris. Characterization by different techniques determined an average size of  $3.4 \pm 0.5$  nm and that the synthesized CDs contain amide and alcohol groups. The interaction between CDs and DNA was studied, observing that the presence of the latter causes a quenching in the CDs fluorescence. Screen printed gold electrodes were modified with the CDs and characterized. These nanostructured electrodes were modified with a 25-base non modified DNA probe corresponding to the *Helicobacter pylori* bacteria. After their incubation with a complementary or non-complementary sequence the redox indicator, safranine, was accumulated by applying successive potential cycles. The signal obtained for the probe modified electrode incubated with the complementary sequence was much higher than that obtained for the non-complementary sequence, proving that the nanostructured electrodes serve as a platform for non-modified DNA probes that keep their recognition capability. In addition, when the probe is hybridized with a sequence containing a single mismatch, the signal is lower than that of the complementary sequence and higher than that of the non-complementary. This confirms that the developed biosensor is capable of detecting single mutations in a 25-base sequence. The developed DNS biosensor was applied to the detection of mutations associated to cystic fibrosis in real PCR DNA samples extracted from blood

cells. For that purpose, the nanostructured electrode was modified with a 100-base sequence complementary to a 373-base fragment of from then exon 11 of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene. This probe was incubated with a complementary sequence, corresponding to healthy patients, and with a sequence containing a mutation consisting of a three nucleotide deletion, which is the most common cause of this illness. The signal obtained after safranine accumulation for the complementary sequence was approximately twice as high as that obtained for the mutated one. This confirms that the developed biosensor is capable of distinguishing between sequences containing the mutation or not. That means that it is capable of differentiating between healthy and unhealthy patients, therefore it could be used as a screening method for the detection of illnesses associated to gene mutations.

## Introducción

---

La creciente demanda de métodos de análisis rápidos y económicos, que permitan la detección de analitos de interés fuera del laboratorio en sectores como el clínico, agroalimentario, industrial, medioambiental o forense ha dirigido la investigación en química analítica hacia el desarrollo de dispositivos sensores que satisfagan estas necesidades. Con el propósito de mejorar las propiedades analíticas de estos, recientemente se han incorporado materiales nanométricos en su diseño. Por este motivo, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos nanomateriales químicamente funcionalizados que permitan la construcción de sensores y biosensores sensibles, estables y robustos.

### **1.1. Electroodos modificados químicamente. Sensores electroquímicos**

Un sensor químico, según la IUPAC, se define como un dispositivo que transforma información química, desde la concentración de un componente específico en una muestra hasta el análisis total de la composición, en una señal analítica útil. Esta información química puede estar originada por una reacción química del analito o por una propiedad física del sistema investigado [Hulanicki, 1991]. Un sensor químico se compone de un elemento químico de reconocimiento y un transductor. El elemento de reconocimiento reconoce al analito en una muestra y, como consecuencia, se produce un cambio en las propiedades químico-físicas del sistema, que el transductor transforma en una señal de utilidad analítica. Un caso particular lo forman el grupo de los biosensores, en los que el elemento de reconocimiento es de tipo biológico. Este tipo de sensores tiene una gran importancia, por lo que serán tratados con mayor detalle en esta introducción.

Cuando el transductor empleado es de tipo electroquímico se denomina electrodo y el dispositivo resultante, sensor electroquímico. Los sensores electroquímicos, comparados con otros tipos de sensores tales como ópticos, térmicos o piezoeléctricos, son especialmente atractivos ya que presentan una serie de ventajas, como son su fabricación sencilla y económica, su sensibilidad, robustez, amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta cortos, además de ser fácilmente miniaturizables, lo que permite desarrollar dispositivos portátiles y fáciles de integrar en sistemas de análisis automático.



Además, otra de las ventajas es la gran variedad de materiales disponibles para la fabricación de electrodos para diferentes aplicaciones [Alegret, 2004]. Los materiales más utilizados en la fabricación de electrodos son metales, óxidos de metales, carbono en diferentes formas y también, aunque menos utilizados, polímeros [Scholz, 2010]. Sin embargo, es importante destacar que, a pesar de que con ellos es posible realizar determinaciones muy sensibles para algunos analitos, los electrodos por sí mismos carecen de selectividad. Por este motivo, con el objeto de dotar a los electrodos de selectividad, en los años 70 comenzaron las investigaciones sobre electrodos modificados químicamente [Lane, 1973a; Lane, 1973b; Moses, 1975; Watkins, 1975].

La modificación de la superficie se realiza con la intención de conseguir un electrodo apropiado para una determinada función, cuyas propiedades son diferentes de las del electrodo sin modificar, es decir, que las características y la respuesta electroquímica dependen de esta modificación. Concretamente, en el campo de los sensores electroquímicos se pretende dotar al dispositivo de selectividad, evitar efectos de envenenamiento del electrodo, preconcentrar el analito y dotarle de propiedades electrocatalíticas [Malinauskas, 1999]. Por tanto, el material modificador se elige con el objetivo de que sea selectivo a un analito determinado o de que actúe como mediador en reacciones que transcurren de manera lenta o, incluso, que se encuentran inhibidas sobre el electrodo sin modificar. Es decir, los electrodos modificados químicamente, en comparación con los electrodos sin modificar, permiten obtener cinéticas de transferencia de carga entre el analito y la superficie del electrodo más rápidas y presentan mejores propiedades analíticas, tales como selectividad, sensibilidad y estabilidad, lo que permite obtener una respuesta adecuada a las necesidades analíticas [Kutner, 1998].

### **1.1.1 Métodos de modificación de electrodos**

Para dotar al electrodo de las características necesarias para la aplicación deseada se lleva a cabo la modificación de la superficie del electrodo con distintos materiales mediante diferentes estrategias. Se ha descrito una gran variedad de métodos de

modificación de electrodos basados en diferentes procedimientos: adsorción, recubrimiento con polímeros o formación de enlace covalente.

- Adsorción

La adsorción puede estar basada en interacciones físicas (fisisorción) o químicas (quimisorción) y puede realizarse directamente depositando el material disuelto y evaporando el disolvente o ser asistida mediante la aplicación de un potencial. Por ejemplo, las moléculas que presentan anillos aromáticos con múltiples enlaces  $\pi$  deslocalizados, como las quinonas [Tse, 1978; Revenga-Parra, 2005], tienden a adsorberse físicamente (fisisorción) sobre electrodos muy hidrofóbicos como los de carbono. En el caso de la adsorción química, el ejemplo más conocido es la unión de tioles sobre superficies metálicas, especialmente, el oro, que permite obtener superficies muy ordenadas, compactas y estables [Darder, 1999].

- Recubrimiento con polímeros

El recubrimiento de la superficie del electrodo con películas poliméricas se puede obtener mediante la deposición o precipitación electroquímica de un polímero ya formado en disolución o, más habitualmente, por polimerización electroquímica. Este procedimiento permite controlar el número de capas del polímero conductor formado mediante la regulación del potencial o de la intensidad aplicados [Adhikari, 2004]. La principal ventaja de la modificación de electrodos por recubrimiento con polímeros es el poder formar de manera sencilla una capa tridimensional en la superficie del electrodo que permita la inclusión de (bio)moléculas, lo que es de gran interés para el desarrollo de aplicaciones (bio)sensoras [Nambiar, 2011].

- Formación de un enlace covalente

La modificación mediante enlace covalente se consigue a través de la formación de un enlace entre grupos funcionales presentes en el material modificador con otros existentes en la superficie del electrodo. Por tanto, este método requiere previamente la generación de grupos funcionales sobre la superficie del electrodo mediante tratamientos físico-químicos o mediante la derivatización con determinadas moléculas para, posteriormente, establecer el enlace covalente a través de reacciones químicas.

Este tipo de modificación presenta ciertas ventajas sobre la modificación por adsorción o por recubrimiento con polímeros tales como que permite obtener superficies modificadas estables a la vez que mantiene un control sobre la estructura y propiedades de la capa modificadora. Sin embargo, el proceso de formación de grupos funcionales en el electrodo suele implicar el uso de condiciones experimentales muy agresivas, como la utilización de ácidos fuertes [Fitzer, 1987], de plasma [Hoffman, 1991] o la aplicación de potenciales extremos [Kepley, 1988], que pueden afectar irreversiblemente la superficie del electrodo, lo que limita la aplicabilidad de este tipo de modificación. Por este motivo, existe un gran interés en el desarrollo de procedimientos que permitan la modificación covalente de la superficie de manera sencilla, con bajo coste y alto rendimiento con el fin de obtener dispositivos que presenten nuevas y mejores propiedades.

En este sentido, el procedimiento de injerto es una metodología muy prometedora, que consiste en la formación de un enlace covalente entre el material modificador y la superficie del electrodo. La formación de un enlace covalente da lugar a una modificación estable y robusta, capaz de soportar tratamientos agresivos, como sonicación prolongada, temperaturas elevadas [Allongue, 1997] o la aplicación de potenciales altos [D'Amour, 2003]. Este procedimiento se ha utilizado para modificar diferentes superficies con el objeto de incorporar nuevas funcionalidades a los materiales, entre las que destacan la biocompatibilidad [Elbert, 1996], el aumento de la hidrofiliidad [Wavhal, 2002], evitar el envenenamiento de superficies catalizadoras [Li, 2015a] o la protección contra la corrosión [Combella, 2005].

Dependiendo del fundamento físico-químico empleado para iniciar el proceso de injerto, se puede distinguir entre quimioinjerto, si es una reacción química [Piletsky, 2000]; termoinjerto, si se trata de radiación térmica [Jiang, 2008]; fotoinjerto, en el caso de radiación UV [Renaudie, 2007]; o electroinjerto, cuando se produce por la aplicación de un potencial eléctrico [Belanger, 2011]. De todos ellos, el procedimiento de electroinjerto despierta un gran interés como método de modificación de diferentes materiales debido a que permite obtener un gran control sobre la misma utilizando para ello una instrumentación sencilla y de bajo coste.

### I.1.1.1 Modificación de electrodos mediante electroinjerto de sales de diazonio

El electroinjerto se puede definir como un proceso mediante el cual se establece un enlace covalente entre un material orgánico y la superficie de un material conductor, a través de la aplicación de un potencial eléctrico, que provoca la activación de determinados grupos funcionales del material a injertar. Por tanto, el proceso de electroinjerto se basa en una transferencia de electrones entre la superficie del material y el modificador, que lleva en su estructura grupos funcionales susceptibles de ser sometidos a este proceso. De esta manera, se produce una reacción que genera un radical o un carbocatión capaces de formar el enlace covalente entre la superficie del material conductor y el agente modificador. Dependiendo del grupo funcional involucrado el electroinjerto puede llevarse a cabo mediante oxidación o reducción.

Entre los grupos funcionales que pueden someterse al proceso de electroinjerto mediante oxidación se encuentran los reactivos de Grignard ( $\text{RMgX}$ ) [Fellah, 2002; Fellah, 2006], los carboxilatos [Brooksby, 2005], las aminas [Adenier, 2004] y los alcoholes [Maeda, 1994]. En cuanto al electroinjerto mediante reducción, los grupos susceptibles son los haluros de alquilo [Andrieux, 1986], los monómeros vinílicos [Voccia, 2006] y las sales de diazonio [Delamar, 1992]. Estas últimas son muy utilizadas debido a su facilidad de preparación, su elevada disponibilidad y su gran reactividad.

Las sales de diazonio son una familia de compuestos cuya estructura presenta un grupo diazonio ( $\text{N}\equiv\text{N}^+$ ), que se genera mediante reacción de diazotación entre una amina aromática primaria y el nitrito sódico, que es el agente causante de la diazotación. La reacción de diazotación fue descubierta en 1858 por Peter Griess mientras estudiaba la reacción del ácido picrámico con el ácido nitroso [Griess, 1858]. Como se muestra en el esquema de la figura I.1, la reacción se inicia con la protonación en medio ácido del grupo nitroso, que, a continuación, pierde agua para formar el catión nitrosonio. La reacción de diazotación sucede a través del ataque nucleófilo de la amina aromática sobre el catión nitrosonio, generando una N-nitrosoamina [Vollhardt, 1999]. A continuación, la transferencia de un protón al

oxígeno forma un grupo hidroxilo y un doble enlace N-N. Finalmente, la protonación del grupo hidroxilo, seguida de pérdida de agua, produce el catión diazonio.

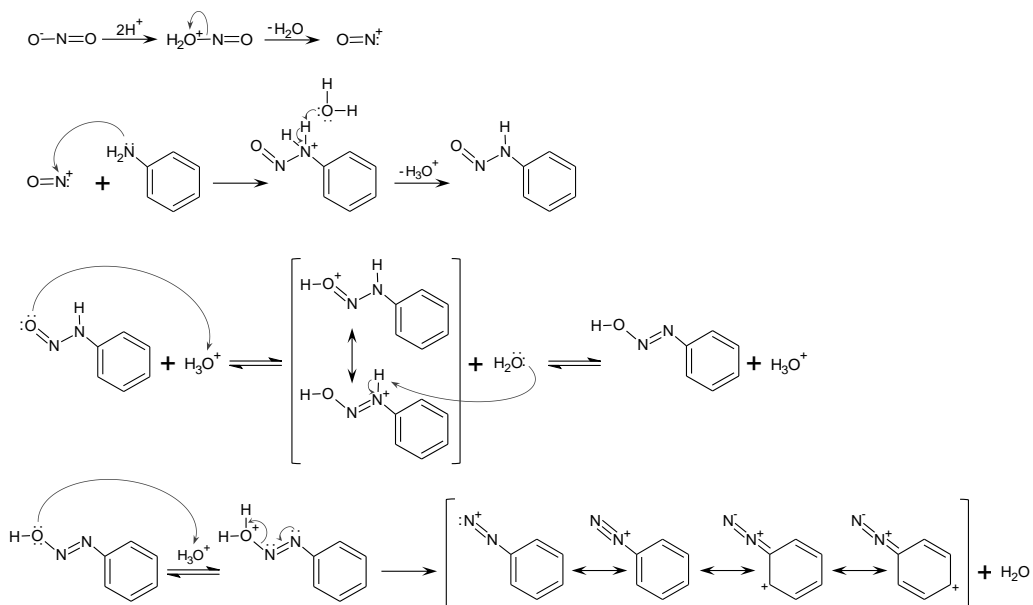


Fig. I.1. Esquema del mecanismo de la reacción de diazotación.

Las sales de arildiazonio son estables a bajas temperaturas, a diferencia de las sales de diazonio alifáticas, como consecuencia de la estabilización de la carga por efecto de resonancia a lo largo del anillo aromático [Moffat, 1978]. Además, deben mantenerse en condiciones de oscuridad, ya que la presencia de luz puede provocar su descomposición [Galli, 1988]. En la descomposición de las sales de diazonio se produce la liberación de una molécula de nitrógeno, generando cationes o radicales arilo muy reactivos, lo que supone que las sales de diazonio presenten una alta reactividad. Por ello, se utilizan como intermediarios de reacción en síntesis orgánica en la sustitución de anillos aromáticos para formar fenoles, haluros y nitrilos, entre otros [Vollhardt, 1999]. Además, el grupo diazonio es un importante atractor de electrones [Lewis, 1959].

El electroinjerto de sales de diazonio es uno de los métodos más habituales de modificación de electrodos. Esta es la razón por la que en este trabajo se ha utilizado

esta reacción para llevar a cabo la modificación de superficies electródicas para su aplicación en el desarrollo de sensores electroquímicos.

El electroinjerto de las sales de diazonio sucede a través de la transferencia de un electrón desde el electrodo a la molécula diazotada, provocando la reducción del grupo diazonio y liberando una molécula de nitrógeno, a la vez que se genera un radical arilo. Este radical se une de forma covalente a la superficie del electrodo, como se muestra en el esquema de la figura 1.2.

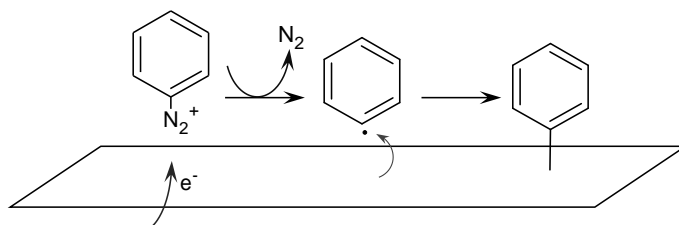


Fig. 1.2. Esquema del mecanismo de electroinjerto de la sal de diazonio.

Delamar, Hitmi, Pinson y Savéant describieron por primera vez en 1992 el electroinjerto de las sales de diazonio sobre electrodos de carbón vítreo [Delamar, 1992], concretamente el electroinjerto de 4-nitrobenzenodiazonio. Desde entonces, esta metodología se ha aplicado para numerosas sales de diazonio sobre una gran variedad de superficies electródicas, tales como diferentes materiales de carbono (carbón vítreo [Downard, 2000], grafito pirolítico altamente ordenado [Allongue, 1997], grafeno [Lomeda, 2008], nanotubos de carbono [Strano, 2003] o diamante [Lud, 2006]), metales nobles, como oro y platino, y otros metales, como cobalto, hierro, cobre, zinc, níquel y aluminio [Hurley, 2004; Bernard, 2003], semiconductores (silicio [Allongue, 2003], arseniuro de galio [Stewart, 2004] u óxido de titanio [Merson, 2004]), u óxidos conductores, como el óxido de indio y estaño (ITO) [Maldonado, 2006].

Una de las limitaciones que presenta la modificación por electroinjerto de las sales de diazonio se deriva precisamente de la gran reactividad del radical arilo, que puede provocar la formación de multicapas del material modificador sobre la superficie del electrodo, debido a la reacción del radical arilo electrogenerado sobre las posiciones libres del anillo aromático de la molécula previamente electroinjertada, en una

reacción conocida como sustitución aromática homolítica [Kariuki, 1999]. De esta manera, el espesor de la película electroinjetada puede variar entre una monocapa y decenas de nanómetros [Ceccato, 2011]. Sin embargo, a medida que aumenta el número de capas en la película electroinjetada, la conductividad a través de ella disminuye [Kariuki, 2001], lo que provoca que el número de radicales arilo electrogenerados sea cada vez menor y que finalmente se produzca la auto-inhibición del crecimiento de la película. Mediante el control de los parámetros experimentales, tales como el potencial aplicado y el tiempo de aplicación de ese potencial o el número de barridos, se evita el crecimiento descontrolado de la película y se puede regular la formación de multicapas de material [Pinson, 2005]. Esto conduce a un control de las propiedades del electrodo modificado, como la conductividad, la reactividad o la estabilidad.

La modificación de electrodos mediante electroinjerto de sales de diazonio, además de permitir obtener un buen control sobre la misma, requiere una instrumentación sencilla y económica, por lo que se ha utilizado para numerosas aplicaciones, por ejemplo, protección frente a la corrosión [Chaussé, 2002], desarrollo de sensores químicos [Flavel, 2010], unión de biomoléculas [Lynam, 2007], desarrollo de biosensores [Liu, 2006] o en microelectrónica [Aswal, 2009], entre otras.

## **1.2. Electrodos modificados con nanomateriales**

Desde hace unos años existe un gran interés en el diseño y la utilización de nuevos materiales en el desarrollo científico y tecnológico. En este sentido, los materiales nanoestructurados o nanomateriales resultan muy atractivos, ya que presentan unas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de los materiales macroscópicos de la misma composición.

Los nanomateriales se caracterizan por poseer al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica, es decir, entre 1 y 100 nanómetros. En función del número de dimensiones que se encuentren en dicha escala, los nanomateriales se pueden clasificar en [Pokropivny, 2007]:

- 0D: todas las dimensiones se encuentran en el intervalo nanométrico. En esta categoría se encuentran las nanopartículas, nanopuntos, puntos cuánticos, fullerenos, nanodiamante...
- 1D: una de las dimensiones supera el límite establecido de 100 nm y abandona la nanoescala. Pertenecen a esta categoría los nanotubos, nanofibras, filamentos...
- 2D: solamente una de las dimensiones se encuentra en la escala nanométrica. Es el caso del grafeno, monocapas, películas delgadas...
- 3D: son nanoestructuras formadas por nanomateriales pertenecientes a las categorías anteriores, como policristales, compósitos, nanomateriales dispersos en una matriz...

Existen dos factores fundamentales que provocan que los nanomateriales se comporten de manera diferente a los materiales macroscópicos: el efecto de superficie y el efecto cuántico de tamaño [Roduner, 2006]. El primer efecto se produce debido a que la proporción de átomos en la superficie es mucho mayor en los materiales nanométricos que en los materiales a escalas mayores. El segundo, en cambio, se debe a que, a medida que disminuye el tamaño en un material, la separación entre los niveles discretos de energía es mayor y se producen discontinuidades. Estos factores afectan a la reactividad química de los materiales, al igual que a sus propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y magnéticas.

Por otro lado, las propiedades únicas de los nanomateriales no solo dependen de su composición y tamaño y forma, sino también, en gran medida, de los grupos funcionales presentes en su superficie. Estos grupos funcionales definen su reactividad, estabilidad física y química, estructura y, por tanto, sus posibles aplicaciones. La modificación de la superficie de los nanomateriales permite incorporar nuevas funcionalidades con el objeto de mejorar su estabilidad, biocompatibilidad, selectividad o sus propiedades ópticas, eléctricas o catalíticas y ampliar sus aplicaciones [Wang, 2011a; Hirsch, 2005]. El proceso de modificación de la superficie se conoce como funcionalización química y consiste en la unión de diferentes materiales orgánicos o inorgánicos a través de enlaces covalentes o uniones no covalentes, como enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas o de van der Waals [Li, 2011c]. Hasta ahora, se ha diseñado un gran número de



nanomateriales funcionalizados con componentes orgánicos, inorgánicos e incluso biológicos, cuyas nuevas propiedades los capacitan para su aplicación en diferentes campos [Alex, 2015; Thakur, 2016]. Para ello, se han descrito numerosos métodos de incorporación de estas funcionalidades a la superficie de los nanomateriales.

Asimismo, es interesante destacar que mediante el procedimiento sintético adecuado es posible introducir grupos funcionales en el nanomaterial durante su síntesis. De esta manera se reduce el número de etapas necesarias para conseguir las funcionalidades deseadas en el material, lo que permite obtener nanomateriales funcionalizados para diferentes aplicaciones de manera más rápida, sencilla y económica.

Con este propósito, en este trabajo se ha utilizado la molécula N,N-bis(3,4-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (figura I.3), con un doble papel como agente reductor y funcionalizador en la síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas y de grafeno modificado químicamente. También se ha utilizado como mediador redox en el desarrollo de sensores y biosensores. Este compuesto pertenece a la familia de las bases de Schiff, cuya característica principal es la presencia de un grupo azometino, que se forma por la condensación de aminas primarias con compuestos carbonílicos. Dentro de esta familia, los productos de la condensación del salicilaldehído con la *orto*-fenilendiamina, cuya nomenclatura IUPAC es N,N'-ortofenilenebis-(salicilaldimina), reciben el nombre genérico de salofen. Por tanto, este ligando, derivado de la reacción de 3,4-dihidroxibenzaldehído con la *o*-fenilendiamina, recibe el nombre de 3,4-dihidroxisalofen o, abreviado, 3,4-DHS.

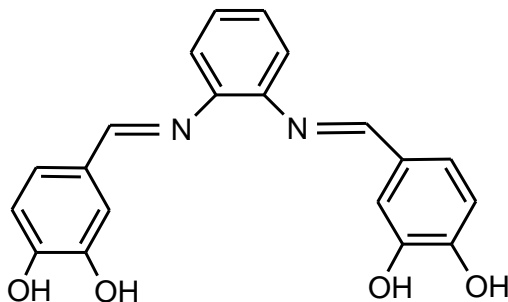


Fig. I.3. Estructura del N,N-bis(3,4-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno o 3,4-DHS.

Este ligando polihidroxilado posee en su estructura átomos donadores, que le permiten formar enlaces de coordinación con metales a través de los nitrógenos de los grupos imina y los oxígenos de los grupos hidroxilo. Sin embargo, la posición de los grupos hidroxilo en relación a los átomos de nitrógeno limita su capacidad para actuar como ligando tetradentado, a diferencia de sus isómeros con un grupo -OH en la posición  $\alpha$  [Revenga-Parra, 2008]. Además, está formada por tres anillos aromáticos, lo que le aporta una cierta planaridad y capacidad de adsorción a través de interacciones con la nube  $\pi$ .

Por otro lado, la presencia en su estructura de dos grupos *orto*-hidroquinona le otorga propiedades reductoras suaves (el potencial de reducción de la *o*-quinona es 0.782 V) [Conant, 1924]. Además, estos mismos grupos son los responsables de sus propiedades catalíticas. Concretamente, el 3,4-DHS adsorbido sobre electrodos de carbón vítreo presenta actividad electrocatalítica frente a la oxidación de hidrazina [Revenga-Parra, 2005]. También se ha publicado un estudio de las propiedades ópticas y electroquímicas resultantes tras su interacción con nanopartículas de oro recubiertas de citrato [Abad, 2011]. En ese estudio se demuestra que el 3,4-DHS es capaz de desplazar al citrato en la superficie de las nanopartículas, formando un conjugado 3,4-DHS/nanopartícula de oro que, depositado sobre un electrodo serigrafiado de carbono, muestra propiedades electrocatalíticas frente a la oxidación de NADH.

En cuanto a sus aplicaciones en biociencia, el 3,4-DHS se ha empleado en diferentes estudios de interacción con ADN [Yuan, 2013; Azani, 2010] y se ha demostrado que puede ser utilizado como indicador electroquímico del proceso de hibridación en el desarrollo de biosensores de ADN [Revenga-Parra, 2007].

Por todo ello, se puede afirmar que la combinación de las propiedades de esta molécula la convierten en un candidato ideal para su uso como agente funcionalizador de nanomateriales con propiedades electrocatalíticas.

El uso de los nanomateriales funcionalizados o no como modificadores de electrodos presenta una serie de ventajas que resultan de gran utilidad en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos. Estos se pueden utilizar de distintas formas, desde para la modificación directa de la superficie electródica hasta la formación de

conjugados o bioconjugados con moléculas o biomoléculas. Esto último puede lograrse ya que las biomoléculas y los nanomateriales poseen un tamaño en el mismo intervalo, por lo que se pueden formar híbridos con propiedades sinérgicas. La nanoestructuración de electrodos permite obtener una mejora en la selectividad, un incremento de la sensibilidad y un aumento en la repetitividad y en la estabilidad [Zhang, 2016]. Esto se consigue gracias a que los materiales, debido a su relación entre área y volumen, proporcionan una mayor superficie específica, lo que permite un mayor contacto entre el analito y el electrodo. Además, los electrodos modificados con nanomateriales pueden comportarse como conjuntos de nanoelectrodos, aumentando la sensibilidad. Adicionalmente, la presencia de los nanomateriales sobre el electrodo puede aumentar la cinética de transferencia de carga, proporcionando tiempos de repuesta más cortos y al mismo tiempo, los materiales nanoestructurados pueden actuar como catalizadores altamente selectivos debido a sus propiedades electrónicas únicas [Wang, 2005]. Estas características de los electrodos nanoestructurados son de gran utilidad en el desarrollo de sistemas sensores y biosensores.

Cuando, además, estos nanomateriales se encuentran funcionalizados es posible lograr, a través de los grupos funcionales presentes en su superficie, la inmovilización de determinadas especies, que pueden ser analitos o elementos de reconocimiento biológico. De esta manera se mejora la selectividad, a la vez que se minimiza la acumulación de impurezas sobre el electrodo, mejorando la repetitividad y la estabilidad. Además, las nuevas funcionalidades incorporadas a la superficie del electrodo a través de la inmovilización de los nanomateriales funcionalizados pueden actuar como electrocatalizadores selectivos, lo que supone otra ventaja adicional, especialmente en el desarrollo de sistemas de detección electrocatalíticos.

En este trabajo se han utilizado diferentes nanomateriales para el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos. En concreto, se han utilizado nanopartículas de oro y nanomateriales de la familia del carbono, más concretamente, nanotubos de carbono, grafeno y nanopuntos de carbono.

### **I.2.1 Nanopartículas de oro**

Las nanopartículas de metales nobles, especialmente las de oro, son unos materiales que despiertan un gran interés, ya que presentan unas propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas y catalíticas muy especiales. Se definen como agrupaciones aisladas de átomos de tamaño inferior a 100 nm, rodeados por una capa estabilizante que evita su agregación. Las propiedades de las nanopartículas de oro (AuNPs) dependen en gran medida de su tamaño, forma y superficie química, que, a su vez, están definidos por las condiciones experimentales utilizadas en su síntesis.

Las AuNPs presentan una gran relación entre superficie y volumen, son conductoras de la electricidad, muestran propiedades catalíticas hacia la oxidación o reducción de diferentes moléculas [Daniel, 2004], pueden actuar como mediadores en procesos electroquímicos [Wang, 2004a] y presentan una excelente biocompatibilidad y baja toxicidad [Khlebtsov, 2011; Murphy, 2008], que las convierten en ideales para su aplicación en biociencia.

Además de estas, las propiedades más destacables de las AuNPs son sus propiedades ópticas, entre las que es importante resaltar su capacidad para amortiguar la emisión de fluoróforos que se encuentren en contacto con ellas y, sobre todo, su propiedad más característica, que es la resonancia de plasmón superficial (SPR) [Yeh, 2012]. La resonancia de plasmón superficial consiste en una oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción de las nanopartículas con una cierta frecuencia al ser excitadas mediante luz [Cao, 2004]. Esto se basa en que el campo electromagnético alterno de la luz incidente interacciona con las partículas, induciendo una polarización en la superficie de las mismas debida al desplazamiento de los electrones libres con respecto a la red de cationes que las forman. En este proceso, se genera una diferencia neta de carga sobre los extremos de las partículas, que actúa como una fuerza restauradora, creando una oscilación dipolar de electrones con una cierta frecuencia (figura I.4).

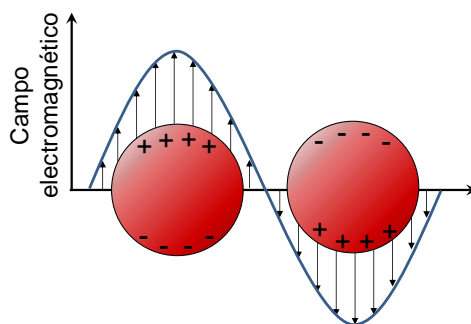


Fig. I.4. Representación esquemática del efecto de resonancia del plasmón superficial.

Este fenómeno provoca que las dispersiones acuosas de nanopartículas de metales nobles presenten una banda de absorción en la zona del visible, en el caso del oro, entre 500 y 550 nm [Jain, 2006], denominada banda de plasmón superficial, que origina que las dispersiones de oro coloidal muestren un color característico, que puede ser marrón, naranja, rojo o morado.

La posición de la banda y, por tanto, el color de la dispersión dependen del tamaño -de hecho, esta banda no es apreciable tanto en nanopartículas de diámetro inferior a 2 nm como en el material a escala macroscópica-, aunque también de la forma de las nanopartículas, del disolvente, de la concentración, de la capa que las rodea, de la carga del núcleo y de la proximidad a otras partículas [Yeh, 2012]. La agregación de las nanopartículas provoca un desplazamiento de la banda de plasmón superficial a longitudes de onda mayores debido al acoplamiento de plasmones superficiales entre partículas vecinas [Su, 2003] y se observa un cambio en el color de la dispersión hacia tonos más azules.

Al igual que otros nanomateriales, su potencial aplicación en diferentes áreas se ve aumentada al funcionalizarlas para capacitarlas para una aplicación específica. En este sentido, además de las extraordinarias propiedades de las nanopartículas de oro, la facilidad para su funcionalización química y bioquímica, han llevado a su aplicación en diversos campos. Así se ha descrito su uso como catalizadores [Remediakis, 2005; Grzybowska-Świerkosz, 2006], como marcadores en microscopía electrónica [Thiberge, 2004] o como marcadores bioquímicos para la detección o

reconocimiento de biomoléculas [Dequaire, 2000]. En concreto, sus excelentes propiedades conductoras y catalíticas las convierten en un material idóneo para su aplicación en (bio)sensores electroquímicos.

### 1.2.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro

Se ha desarrollado una gran variedad de métodos para producir nanopartículas metálicas. Para la generación de nanomateriales en la nanoescala existen dos estrategias generales: *top-down* o físicos y *bottom-up* o químicos. Los métodos físicos consisten en la eliminación de parte de un sustrato de oro utilizado como material de partida, de manera que lo que quede sean las nanoestructuras buscadas, mientras que los métodos químicos se basan en la unión de átomos, generalmente producidos por la reducción de iones, para generar las nanoestructuras. Los métodos físicos, tales como fotolitografía, litografía de haz de electrones [Hu, 2010] o ablación láser [Huang, 2006], son caros debido a la cantidad de material eliminado, a la vez que requieren de instrumentación costosa. Por esta razón, en la síntesis de nanopartículas de oro se utilizan fundamentalmente métodos químicos.

Los métodos químicos están basados en la reducción de iones de oro a átomos, que actúan como núcleos a los que se van incorporando nuevos átomos, provocando el crecimiento de las partículas. Este proceso se lleva a cabo en presencia de un agente estabilizante, que se adsorbe sobre la superficie e inhibe la agregación de las nanopartículas, ya que estas en disolución tienen tendencia a agregarse debido a interacciones de van der Waals [Sifontes, 2010].

El método más habitual de síntesis de nanopartículas esféricas es el desarrollado por Turkevich [Turkevich, 1951], que consiste en la reducción de una sal de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ) con ácido cítrico en agua en ebullición. En este caso, los iones de citrato actúan como agente estabilizante a la vez que como agente reductor. El método fue optimizado por Frens [Frens, 1973], quien describió que, variando la proporción entre oro y citrato, se podían obtener nanopartículas relativamente estables de diferente tamaño, entre 10 y 20 nm. Este método se utiliza para conseguir nanopartículas rodeadas por una capa lábil, que permite el intercambio de ligandos para obtener nanopartículas funcionalizadas.

Otro método de síntesis es el descrito por Brust y Schiffrin en el que se obtienen nanopartículas de oro estabilizadas por tioles mediante una reducción en dos fases utilizando bromuro de tetraoctilamonio (TOAB) como el agente de transferencia de fase y borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) como agente reductor en presencia de dodecanotiol [Brust, 1994]. Este método permite obtener nanopartículas más pequeñas que el método de Turkevich-Frens, entre 1.5 y 5 nm, variando las condiciones de reacción.

Además, se han descrito otros métodos de síntesis, como la síntesis fotoquímica [Sau, 2001; Mallick, 2001], sonoquímica [Chen, 2001a], radiolisis [Henglein, 1998; Dawson, 2000], termolisis [Nakamoto, 2002] o biosíntesis, utilizando extractos de plantas [Mittal, 2013] u hongos [Shankar, 2003].

Cualquiera que sea el método utilizado para la síntesis de las nanopartículas, el objetivo es conseguir que sean monodispersas, con idéntica morfología, composición química y estructura cristalina y que se encuentren como estructuras aisladas, es decir, que no existan fenómenos de agregación.

### **1.2.1.2 Funcionalización de nanopartículas de oro**

Las nanopartículas de oro son inestables en disolución, por lo que es necesario modificar su superficie con un agente estabilizante que evite su agregación. Los mecanismos más utilizados para la estabilización de las nanopartículas son la estabilización de carga mediante la adsorción de moléculas cargadas, como el citrato [Alex, 2015] y la estabilización estérica por recubrimiento de la superficie de las nanopartículas con moléculas grandes, como polímeros [Corbierre, 2004], macromoléculas [Thanh, 2010], dendrímeros [Kim, 2004] o surfactantes [Edgar, 2012].

Por otro lado, la funcionalización de la superficie de las nanopartículas con determinados compuestos o grupos funcionales puede capacitarlas para una aplicación específica. En algunos casos, el agente estabilizante contiene los grupos funcionales adecuados para una función específica y en otros casos, es necesario incorporar nuevas moléculas a la superficie de la nanopartícula o al agente estabilizante. Por tanto, se puede decir que la funcionalización de las nanopartículas

se suele llevar a cabo mediante dos estrategias: la modificación de la superficie de nanopartículas previamente sintetizadas o la incorporación de un agente modificador en la síntesis del oro coloidal.

La primera generalmente se ha utilizado a partir de nanopartículas sintetizadas mediante el método de Turkevich-Frens [Frens, 1973], en el que las nanopartículas de oro sintetizadas se encuentran estabilizadas por moléculas de citrato. El citrato es un ligando lábil, que puede ser desplazado por otros compuestos mediante reacciones de intercambio de ligandos. Los compuestos más habitualmente empleados para este fin son aquellos que contienen un grupo tiol en su estructura debido a la afinidad que presenta este grupo por el oro. A través de la unión tiol-oro se pueden unir fácilmente una gran variedad de moléculas [Love, 2005; Zaluzhna, 2012; Toikkanen, 2008] y biomoléculas [Cobley, 2011]. Además de la quimisorción de tioles, se ha utilizado también la química de la coordinación para la incorporación de ligandos al oro en la funcionalización de nanopartículas a través de otros grupos funcionales, tales como grupos oxigenados [Jena, 2007], grupos nitrogenados [Moore, 2004; Griffin, 2007] o grupos fosforados [Pettibone, 2011]. Mediante el uso de ligandos bifuncionales también es posible incorporar a la superficie de las nanopartículas una enorme variedad de compuestos.

La segunda estrategia consiste la obtención de nanopartículas funcionalizadas en el propio proceso de síntesis, eliminando así etapas de reacción para obtener el producto deseado, que pueden ser lentas y pesadas y pueden influir tanto en el tamaño como en la forma de las nanopartículas.

#### I.2.1.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas

Como ya se ha comentado, la síntesis de nanopartículas de oro se suele realizar en presencia de un agente estabilizante. La elección del agente estabilizante adecuado puede resultar en la formación de nanopartículas ya funcionalizadas, disponibles para su posterior aplicación. En este caso, durante la reducción de la sal de oro para la formación de las nanopartículas, el agente funcionalizador se une a la superficie de las nanopartículas, proporcionando, además, estabilidad y control sobre su tamaño [Zhou, 2009b].



Los métodos de síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas más utilizados están basados en modificaciones del procedimiento sintético descrito por Brust y Schiffrin [Brust, 1994; Brust, 1995]. Por medio de este método se producen nanopartículas de oro estabilizadas por una monocapa orgánica de tioles. Además, se han descrito otros métodos de síntesis de nanopartículas funcionalizadas con diferentes compuestos unidos a la superficie del oro a través de grupos tiol [Chen, 1999; Aguila, 2000; Cliffl, 2000; Templeton, 2000a; Templeton, 2000b; Kometani, 2001; Shon, 2001].

También se encuentran en la bibliografía ejemplos de síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con moléculas orgánicas cuyas propiedades combinadas permiten su aplicación en diferentes áreas. Así, se ha descrito el uso de crocina [Hoshyar, 2016] o de quercetina [Das, 2013] en la síntesis de nanopartículas funcionalizadas para su aplicación en quimioterapia; de azacriptando [Lee, 2007] o ácido tánico [Aswathy Aromal, 2012], con aplicación en electrocatálisis; o ácido 3-aminofenilborónico [Ma, 2005] o ácido 4-mercaptofenilborónico [Chen, 2017], con aplicación en sensores ópticos de glucosa y dopamina, respectivamente. En todos los casos, es el propio agente modificador el que actúa como reductor en la síntesis de las nanopartículas.

### **1.2.2 Grafeno**

El grafeno es un material bidimensional formado por una monocapa de átomos de carbono con hibridación  $sp^2$  dispuestos en forma de hexágonos, como en un panal de abeja [Geim, 2007]. Constituye la unidad básica estructural de otros materiales de carbono, como el grafito, los nanotubos de carbono o los fullerenos [Allen, 2010]. Por este motivo ya había sido estudiado antes de que Geim y Novoselov consiguieran aislar una capa de grafeno por primera vez en 2004 [Geim, 2007].

Las excepcionales propiedades del grafeno se deben a los fuertes enlaces entre carbonos  $sp^2$  y a la conjugación del sistema  $\pi$  de su estructura. Gracias a ello, presenta una alta conductividad eléctrica [Stankovich, 2007] y térmica [Ghosh, 2008]. Presenta, además, unas excelentes propiedades mecánicas, con elevados módulo de Young y resistencia a la tracción [Lee, 2008], por lo que es un material muy flexible y resistente.

Además, muestra una gran estabilidad térmica [Wu, 2009]. Una de sus propiedades más llamativas es su transparencia óptica. Una monocapa de grafeno muestra una transmitancia del 97.7% [Nair, 2008], lo que hace que sea un material prometedor para la fabricación de dispositivos electrónicos, tales como pantallas. Además, presenta una elevada área superficial [Stoller, 2008], lo que puede ser interesante de cara al desarrollo de sensores, ya que permite la inmovilización de gran cantidad de moléculas sobre su superficie. En cuanto a su reactividad, cabe destacar que el grafeno es un material poco reactivo en el plano basal, mientras que la presencia de insaturaciones en los extremos hace que la reactividad sea muy alta, es decir, es químicamente anisótropo [Banks, 2005].

Las extraordinarias propiedades del grafeno lo convierten en un material muy interesante para un gran abanico de aplicaciones, con un gran potencial para su aplicación en sensores y biosensores electroquímicos debido a que presenta unas excelentes propiedades electroquímicas, tales como una amplia ventana de potencial, una baja resistencia a la transferencia de carga, una excelente actividad electrocatalítica [Gao, 2015] o la capacidad de evitar el envenenamiento de los electrodos [Lin, 2009].

#### **1.2.2.1 Síntesis de grafeno**

El método utilizado por Geim y Novoselov para el aislamiento de una lámina de grafeno mediante la exfoliación mecánica de grafito con una cinta adhesiva [Geim, 2007] puede generar grafeno de una alta calidad, sin embargo no es adecuado para la producción a gran escala. Por este motivo, se han desarrollado diferentes métodos para la síntesis de grafeno, tales como crecimiento epitaxial [Sutter, 2008], deposición química en fase vapor (CVD) de un hidrocarburo [Mattevi, 2011], exfoliación en fase líquida [Hernandez, 2008], exfoliación química [Dreyer, 2010] y síntesis orgánica [Wu, 2007].

Entre estos métodos, la exfoliación química atrae un gran interés, ya que es un método sencillo y no requiere una equipación especial. Este proceso consiste en la oxidación de grafito a óxido de grafito, seguida de la exfoliación del óxido de grafito en láminas individuales de óxido de grafeno (GO) y, por último, la reducción del óxido de grafeno a grafeno reducido (rGO), que presenta una menor proporción de oxígeno [Bai, 2011]. El método más habitual de síntesis de óxido de grafeno es el desarrollado

por Hummers [Hummers, 1958; Xu, 2008], que consiste en un tratamiento oxidante del grafito con  $\text{KMnO}_4$  y  $\text{NaNO}_3$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para formar óxido de grafito y la posterior exfoliación de GO en agua mediante la aplicación de ultrasonidos.

El GO es una lámina aislada de óxido de grafito. Su estructura (figura I.5B) consta de una parte hidrofóbica, que es la estructura básica del grafeno (figura I.5A), y de una parte hidrofílica formada por grupos oxigenados, como hidroxilos, epóxidos, carbonilos y carboxilos [Gao, 2009]. Estos grupos funcionales generados en el proceso de oxidación se encuentran tanto en los bordes como en el plano basal y facilitan la solubilidad del óxido de grafeno en agua. Además, la presencia de los grupos funcionales hace que el GO pueda ser funcionalizado por reacción con diferentes compuestos con el objeto de para mejorar sus propiedades y obtener un material versátil para una gran variedad de aplicaciones [Park, 2009].

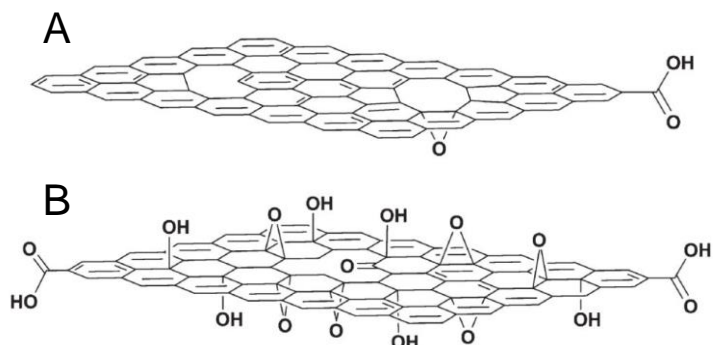


Fig. I.5. Estructura de (A) grafeno y (B) óxido de grafeno.

Por otra parte, la oxidación del grafito provoca la ruptura parcial de la conjugación  $\pi$ , lo que produce una pérdida de la conductividad y hace que el GO pueda ser semiconductor o aislante dependiendo del grado de oxidación y de la proporción entre carbonos de tipo  $\text{sp}^2$  y  $\text{sp}^3$ . Esto limita la aplicabilidad del GO en el desarrollo de sensores electroquímicos, por lo que se hace necesario recuperar la conductividad eléctrica. Una manera de conseguirlo es restaurando la red  $\pi$  de los carbonos aromáticos a través de la reducción del GO [Pei, 2012]. Mediante la reducción de GO se puede obtener un material con una estructura similar al grafeno, que sin embargo, presenta grupos funcionales en su superficie. Es decir, mediante la reducción de GO

es posible obtener directamente grafeno funcionalizado químicamente. De esta manera se puede obtener un material conductor que presente las funcionalidades deseadas en una sola etapa de reacción, de forma rápida y sencilla.

#### **I.2.5.1 Preparación de grafeno modificado químicamente**

La reducción de GO produce un material similar al grafeno, pero con propiedades ligeramente distintas, en el que se han eliminado gran parte de los grupos oxigenados y se ha reestablecido parcialmente la conjugación  $\pi$ , aunque existen grupos funcionales residuales y defectos que alteran la estructura plana del carbono [Pei, 2012]. Este material (rGO) se conoce con varios nombres, como grafeno reducido, óxido de grafeno reducido, grafeno funcionalizado, grafeno modificado químicamente o grafeno convertido químicamente [Eda, 2010]. La reducción de GO para recuperar parcialmente las propiedades del grafeno es un proceso de gran importancia, ya que según el método de reducción se puede obtener grafeno reducido con diferentes propiedades y, por lo tanto, con distintas posibles aplicaciones. Se han descrito diferentes métodos para conseguir la reducción del GO y producir rGO, que se pueden agrupar en métodos térmicos, fotocatalíticos, electroquímicos y químicos.

La reducción térmica se basa en la descomposición en gases de los grupos funcionales oxigenados presentes en el GO [Schniepp, 2006]. Puede aplicarse sobre láminas previamente exfoliadas [Zhao, 2010] o puede utilizarse como un método de síntesis de rGO directamente a partir de óxido de grafito, ya que el aumento de presión provocado por esos gases puede producir la exfoliación de las láminas del grafito, además de reducir los grupos funcionales [McAllister, 2007]. Dentro de esta categoría se puede incluir también el método solvothermal, que consiste en elevar la temperatura muy por encima del punto de ebullición por efecto de la presión generada durante el calentamiento en un recipiente sellado [Wang, 2009a]. Además, también se ha descrito el uso de las microondas [Zhu, 2010] y de la irradiación de luz visible [Cote, 2009; Zhang, 2010] como métodos de calentamiento para producir la reducción termal de GO.

La luz también es la responsable de la reducción del GO en los métodos fotocatalíticos. Esta, en presencia de catalizadores, puede producir reacciones

químicas fotoinducidas que provocan la reducción de los grupos funcionales. Se ha descrito el uso como catalizadores de  $\text{TiO}_2$  [Kamat, 1993],  $\text{ZnO}$  [Williams, 2009] o  $\text{BiVO}_4$  [Ng, 2010].

La reducción electroquímica puede llevarse a cabo sobre películas de GO depositadas en la superficie del electrodo [Zhou, 2009a] o directamente sobre una dispersión de GO [Casero, 2013]. Se ha descrito, además, un método para la reducción de GO mediante deposición electroforética [An, 2010].

La reducción mediante el uso de reactivos químicos presenta algunas ventajas sobre los otros métodos descritos. En este caso, la reducción se produce por reacción química entre el GO y el agente reductor. Habitualmente, esta reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente o mediante un calentamiento moderado, a diferencia de los métodos térmicos, por lo que no se requiere una equipación especial. Además, la reducción química permite incorporar nuevas funcionalidades sobre la lámina de grafeno reducido resultante, que provienen del reductor utilizado. De esta manera, se puede lograr la reducción de GO y la funcionalización del rGO en una sola etapa. Estos reactivos químicos responsables del proceso de reducción pueden ser agentes reductores fuertes, como hidrazina [Stankovich, 2007] o sus derivados, dimetilhidrazina [Stankovich, 2006] o 4-hidrazinilpiridina [Shin, 2017], borohidruro sódico [Shin, 2009] o ácido yodhídrico [Pei, 2010]. Otros agentes reductores utilizados son el ácido ascórbico [Fernández-Merino, 2010], la hidroquinona [Wang, 2008a], disoluciones concentradas de bases como KOH o NaOH en caliente [Fan, 2008], hidroxilamina [Zhou, 2011], pirogalol [Wang, 2008b] o urea [Lei, 2012].

En muchos de estos métodos de reducción se producen reacciones químicas que son selectivas hacia uno varios grupos funcionales, por tanto, es posible que mediante la utilización de un solo método no sea posible la eliminación de todos los grupos oxigenados. Por ello, algunos autores proponen el uso de una combinación de varios de estos métodos para lograr una reducción más efectiva [Gao, 2009; Eda, 2008].

### 1.2.3 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) son cilindros formados por una o varias láminas de grafeno. Estos presentan un diámetro del orden de unos pocos nanómetros,

dependiendo del número de capas, sin embargo, en longitud se encuentran en la escala micrométrica [Eatemadi, 2014]. Fueron descubiertos en 1991 por Iijima [Iijima, 1991], abriendo un campo de investigación muy amplio con gran variedad de aplicaciones debido a sus interesantes propiedades, tanto físicas como químicas.

Existen diferentes tipos de nanotubos de carbono. Se pueden clasificar atendiendo a dos criterios: el número de capas que lo forman y la forma en la que se enrolla la lámina de grafeno [Eatemadi, 2014]. Así, en función del número de capas se puede distinguir entre nanotubos de pared simple (SWCNTs) o de pared múltiple (MWCNTs). Además, estos últimos pueden estar formados por varios nanotubos de pared simple concéntricos de manera que los de mayor diámetro rodean a los más pequeños, en lo que se conoce como el modelo de muñeca rusa, o pueden estar formados por una sola lámina enrollada sobre sí misma en forma de espiral, en el modelo de pergamino. Por otro lado, atendiendo a la forma en la que se enrolla la lámina de grafeno se puede diferenciar entre zigzag, sillón y quirales (figura I.6).

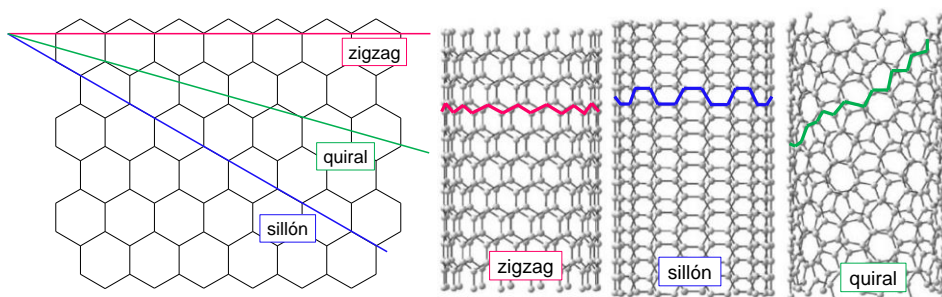


Fig. I.6. Representación esquemática de la construcción de un nanotubo por enrollamiento de una lámina de grafeno.

El potencial de los nanotubos para su aplicación en diferentes campos se debe a sus extraordinarias propiedades, que dependen del tipo de nanotubo y de su longitud. Estos presentan una elevada conductividad eléctrica a través de los anillos de carbonos  $sp^2$  que lo forman. En concreto, los nanotubos de tipo sillón son siempre metálicos, mientras que los de tipo zigzag y quirales pueden ser metálicos, semiconductores o aislantes [Cao, 2003]. Además, los nanotubos muestran una elevada resistencia a la tracción, debido a los enlaces  $sp^2$  entre los átomos de

carbono [Eatemadi, 2014] y una gran flexibilidad, lo que permite que puedan doblarse y recuperar la forma sin sufrir cambios estructurales [Iijima, 1996]. Es interesante destacar que los nanotubos de carbono presentan una elevada área superficial, lo que puede permitir la adsorción de moléculas y biomoléculas sobre su superficie. Además, son biocompatibles y, en ausencia de defectos, químicamente inertes. Estas características los hacen muy interesantes de cara a aplicaciones en biociencia.

A pesar de todas estas cualidades, el uso de los nanotubos de carbono tiene una limitación importante y es la tendencia a la agregación que presentan debido a interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos aromáticos, que los mantienen unidos y los hacen insolubles en todos los disolventes y difíciles de dispersar. Para poder utilizar las propiedades especiales de este material, es necesaria su dispersión. Esta se puede conseguir mediante métodos mecánicos, utilizando ultrasonidos, procesos de calandrado [Gojny, 2004], agitación [Sandler, 1999] o extrusión [Villmow, 2008], o mediante funcionalización química de los nanotubos. Uno de los métodos más efectivos es la funcionalización no covalente con surfactantes [Yu, 2007], que disminuyen la tensión superficial, a la vez generan fuerzas electrostáticas repulsivas, previniendo de esta manera la agregación.

Estas interesantes propiedades electrónicas, químicas y mecánicas los hacen muy atractivos para diferentes aplicaciones [Eatemadi, 2014; Baughman, 2002], especialmente, para su aplicación en sensores y biosensores electroquímicos, ya que, además, pueden mejorar el proceso de transferencia de carga [Lawal, 2016].

### **1.2.3.1 Síntesis de nanotubos de carbono**

Los métodos más habituales de síntesis de nanotubos de carbono son: descarga por arco eléctrico, ablación láser y deposición química en fase vapor (CVD) y síntesis en llama. Todos ellos se basan en la vaporización de una fuente de carbono que se condensa en forma de nanoestructuras de carbono. En los dos primeros métodos la fuente de carbono empleada es el grafito. En el método de descarga por arco eléctrico la vaporización se consigue gracias a la aplicación de una corriente [Anazawa, 2002] y en el método de ablación láser, mediante la incidencia de un láser [Muñoz, 2000]. En los métodos de síntesis por deposición química en fase vapor y

síntesis en llama se utilizan hidrocarburos como fuente de carbono y catalizadores metálicos para la generación de las nanoestructuras [Hsiou, 2004; Baker, 1972; Vander Wal, 2001].

#### **I.2.4 Nanopuntos de carbono**

En la familia de los nanomateriales de carbono se encuentran varios miembros pertenecientes a la categoría 0D: fullerenos, nanopuntos de carbono (CNDs), puntos cuánticos de grafeno (GQDs) y nanodiamante [Georgakilas, 2015]. Los fullerenos, CNDs y GQDs son materiales gráfiticos y están compuestos principalmente por carbonos  $sp^2$ , aunque pueden contener algunos átomos de tipo  $sp^3$  en los bordes o en los defectos, mientras que el nanodiamante está formado por carbonos  $sp^3$  y  $sp^2$  en diferentes proporciones y puede presentar una mezcla de regiones amorfas y gráficas. Dentro de los nanomateriales de carbono 0D gráfiticos, los fullerenos son estructuras esféricas huecas constituidas por átomos de carbono dispuestos en forma de hexágonos y pentágonos, sin embargo, los CNDs y los GQDs son estructuras compactas.

Los CNDs y los GQDs son estructuralmente distintos. Los CNDs son nanopartículas quasiesféricas con diámetros entre 2 y 10 nm y pueden tener una estructura cristalina o amorfa [Ray, 2009]. Por el contrario, los GQDs son el producto del corte del grafeno en pequeños trozos entre 2 y 20 nm, por lo que presentan una estructura cristalina [Ponomarenko, 2008]. Además son anisotrópicos, con unas dimensiones laterales mayores que su altura, y pueden tener una o varias capas.

Los nanopuntos de carbono fueron descubiertos por casualidad en 2004 durante la purificación mediante electroforesis de nanotubos de carbono [Xu, 2004]. Se los conoce también con el nombre de nanopuntos carbogénicos, debido a su alto contenido en oxígeno [Bourlinos, 2008; Liu, 2011b] o con el de carbono fluorescente, ya que presentan una gran capacidad de emisión fluorescente [Li, 2012]. Precisamente esta propiedad es la razón por la que este material está siendo ampliamente estudiado. Una característica que presenta la fluorescencia de los nanopuntos de carbono es que tanto la intensidad como la longitud de onda de emisión son dependientes de la longitud de onda de excitación. Este efecto se puede



deber a dos causas: a la presencia de nanopuntos de diferente tamaño, es decir, al efecto cuántico [Zhao, 2008], o a que la emisión se produce desde diferentes niveles de energía existentes debido la presencia de distintos grupos funcionales [Tang, 2012]. En ocasiones, los nanopuntos “desnudos” no son fluorescentes y es necesaria la pasivación de la superficie para lograr que lo sean [Bourlinos, 2008; Sun, 2008]. Asimismo, la fluorescencia de los nanopuntos de carbono puede ser amortiguada tanto por aceptores como por dadores de electrones, en un proceso de transferencia electrónica fotoinducida [Li, 2012].

Los nanopuntos de carbono son un material muy interesante debido a que presentan unas propiedades fotofísicas comparables a las de los puntos cuánticos de semiconductores (QDs), tales como su alta eficiencia cuántica o su fotoestabilidad [Baker, 2010]. Además, presentan otras propiedades destacables que los diferencian, como son su alta solubilidad, provocada por la presencia de grupos funcionales hidrofílicos, estabilidad química, facilidad de funcionalización, baja toxicidad y buena biocompatibilidad [Li, 2012], lo que ha propiciado su aplicación como marcadores biológicos [Li, 2010], en bioimagen [Yang, 2009] y transporte de fármacos [Karthik, 2013].

La combinación de las propiedades de los nanopuntos de carbono los convierte en un material excelente para su aplicación en sensores y biosensores ópticos basados en la interacción entre el analito y los nanopuntos, que provoca la amortiguación o la recuperación de la fluorescencia. Así se han descrito sensores para la detección de diferentes analitos, entre otros, iones metálicos, aniones, moléculas orgánicas y biomoléculas [Zuo, 2015]. Sin embargo, a diferencia de otros nanomateriales de carbono, existen pocos ejemplos de su aplicación en sensores electroquímicos [Nguyen, 2016b].

### **1.2.4.1 Síntesis de nanopuntos de carbono**

Los métodos para la síntesis de nanopuntos de carbono se pueden agrupar en dos categorías generales: métodos físicos (*top-down*) y métodos químicos (*bottom-up*). Como se ha comentado anteriormente, los métodos físicos se basan en la ruptura de materiales de carbono de mayor tamaño, como nanotubos de carbono [Xu, 2004;

Tao, 2012; Bottini, 2006], grafito [Tao, 2012; Zheng, 2009], nanodiamante [Zhang, 2013] y carbón activo [Dong, 2010]. Entre los métodos físicos el más utilizado es la ablación láser seguida de una etapa de pasivación [Sun, 2006; Li, 2011b]. Otros métodos físicos utilizados en la síntesis de nanopuntos de carbono son la descarga por arco eléctrico [Xu, 2004] y el tratamiento con plasma [Li, 2013; Jiang, 2010].

Los métodos químicos se basan en la utilización de diferentes materiales de partida, que, mediante reacciones químicas, producen nanopuntos de carbono. Entre los métodos químicos descritos en la bibliografía se encuentran la síntesis electroquímica [Zhao, 2008; Zheng, 2009; Li, 2011d; Hou, 2015], las rutas sintéticas soportadas [Liu, 2009a; Lai, 2012; Yang, 2013], combustión [Wang, 2015c; Li, 2015b; Kasibabu, 2015], síntesis hidrotermal [Dong, 2013; Wu, 2013; Xu, 2015; Tong, 2015; Wang, 2015a], oxidación en medio ácido [Liu, 2007; Peng, 2009; Zhang, 2015] y el uso de microondas y ultrasonidos [Zhu, 2009; Wang, 2011b; López, 2015; Chen, 2015].

Los métodos químicos más empleados para la síntesis de nanopuntos de carbono se basan la carbonización de un precursor que actúa como fuente de carbono. La carbonización se puede conseguir mediante diferentes métodos, como calentamiento [Wang, 2015c], hidrotermal [Dong, 2013] y microondas [Chen, 2015]. Se han descrito infinidad de métodos basados en la carbonización de diferentes precursores, tales como el hollín de una vela [Liu, 2007], gas natural [Tian, 2009], citrato de amonio y de octadecilamonio [Bourlinos, 2008], ácido cítrico [Dong, 2013; Wang, 2015b], ácido bórico [Jahan, 2013; Shen, 2014], glicerol [Lai, 2012; Xue, 2011], glucosa [Peng, 2009; Li, 2011a; Yang, 2011; Ma, 2012], etilenglicol [Hu, 2013], N-acetilcisteína [Chen, 2013a], diamina [Sk, 2014] o benceno [Jiang, 2010]. También se han utilizado como precursores fuentes naturales, como zumo de naranja [Sahu, 2012], zumo de plátano [De, 2013], leche de soja [Zhu, 2012], carne [Wang, 2013], bebidas comerciales [Liao, 2015], café [Jiang, 2014], cerveza [Wang, 2015d], huevo [Wang, 2012], patata [Xu, 2015], seda de gusano [Wu, 2013], sacarosa [Peng, 2009; Xu, 2014], almidón [Peng, 2009], e incluso, hierba [Liu, 2012]. Estos precursores suelen ser ricos en grupos funcionales químicos como carboxilos, aminas, hidroxilos... que facilitan la posterior modificación para modular las propiedades de los nanopuntos de carbono.

Generalmente, tras el proceso de síntesis se lleva a cabo una etapa de purificación, que puede ser una combinación de diferentes técnicas, como ultracentrifugación, filtración, diálisis, cromatografía en columna o electroforesis en gel [Georgakilas, 2015].

### **1.2.5 Funcionalización de nanomateriales de carbono**

Como ya se ha comentado, la funcionalización de los nanomateriales se realiza con la finalidad de aumentar sus posibles aplicaciones mediante la incorporación de nuevos grupos funcionales en su superficie. En la funcionalización de los materiales de carbono, se debe tener en cuenta que, desde el punto de vista químico, la superficie de los nanotubos de carbono y del grafeno es esencialmente la misma, por lo que es posible utilizar estrategias similares. Ambas superficies están formadas teóricamente por una lámina de carbonos  $sp^2$  unidos entre sí formando una red bidimensional de estructuras hexagonales. Sin embargo, estos materiales presentan defectos en su estructura, tales como ciclos de cinco o siete carbonos, ausencia de uno o varios átomos de carbono, presencia de átomos intersticiales o presencia de heteroátomos u otras impurezas [Banhart, 2011]. La presencia de estos defectos va a influir fuertemente en la química de la superficie de los nanomateriales de carbono, ya que el plano basal es muy poco reactivo, mientras que los bordes o los defectos son sitios activos con una alta reactividad [Hirsch, 2005; Loh, 2010; Bahr, 2002], lo que va a permitir la unión covalente de moléculas que aporten nuevas funcionalidades. Además, en el caso de los nanotubos de carbono, la curvatura de la superficie aumenta su reactividad [Malig, 2011].

Por otro lado, el plano basal de los nanomateriales de carbono presenta una alta densidad electrónica  $\pi$ , lo que favorece la adsorción de moléculas sobre su superficie [Radovic, 1997]. Esto resulta de utilidad para lograr la funcionalización no covalente y, además, hace que la superficie presente una ligera basicidad [Leon y Leon, 1992].

Teniendo en cuenta estas propiedades, se puede decir que hay dos tipos de métodos generales de funcionalización de los nanomateriales de carbono en función del mecanismo de unión entre los compuestos funcionales y el nanomaterial: covalente y no covalente.

### 1.2.5.1 Métodos de funcionalización no covalente

La funcionalización no covalente no altera la conjugación  $\pi$  [Georgakilas, 2012; Simmons, 2009]. Por este motivo hay un gran interés en el desarrollo de interacciones no covalentes entre los nanomateriales de carbono y los componentes funcionales. Este tipo de funcionalización resulta muy útil cuando se quieren modificar superficies con una estructura ordenada con áreas en las que abundan los carbonos aromáticos, que presentan un sistema electrónico  $\pi$  deslocalizado, como es el caso de los nanotubos de carbono [Simmons, 2009; Chen, 2001b] o el grafeno [Bai, 2009; Kuila, 2012]. Se puede realizar mediante interacciones hidrofóbicas [Zhang, 2006], apilamiento  $\pi$ - $\pi$  [Zhao, 2009], por envoltura con polímeros [O'Connell, 2001; Enyashin, 2007] o, en el caso de los nanotubos, por interacciones endoédricas [Hirsch, 2002].

El primer método, interacción hidrofóbica, consiste en utilizar surfactantes, es decir, compuestos formados por cadenas alifáticas que, por un extremo, interaccionan con la superficie hidrofóbica del carbono y, por el otro, funcionalizan la superficie con grupos hidrofílicos químicamente activos. Un ejemplo muy utilizado de funcionalización de nanotubos de carbono para lograr su solubilización es el empleo del surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), que se adsorbe a la superficie de los nanotubos y los recubre con grupos sulfato [Yu, 2007]. Se ha descrito también la utilización de surfactantes catiónicos, como el bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) [Whitsitt, 2003] o no iónicos, como el polioxoetilenoctilfeniléter (Triton X-100) [Geng, 2008].

El segundo método, apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , tiene lugar con moléculas que presentan grupos aromáticos capaces de interaccionar con las regiones aromáticas de las superficies de carbono, por ejemplo, moléculas con un grupo pireno en su estructura, que se puede unir al plano basal del grafeno [Loh, 2010] o a las paredes de los nanotubos de carbono [Leyden, 2010] mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$ , actuando como un punto de anclaje para la unión de diferentes grupos funcionales.

El método de envoltura con polímeros se basa en la adsorción de una molécula polimérica en la superficie de los nanomateriales de carbono a través de interacciones electrostáticas de manera que forma una capa protectora. Los grupos

funcionales presentes en el polímero pueden promover la unión de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos [Luong, 2004].

En el método endoédrico las moléculas penetran a través de defectos en los extremos o en las paredes mediante capilaridad en las cavidades internas de los CNTs, donde se almacenan. Se conocen casos de inserción de nanopartículas, tales como  $C_{60}$ , oro, plata y platino [Georgakilas, 2007], así como de pequeñas biomoléculas, como proteínas o ADN [Hirsch, 2002; Tsang, 1997].

Además de los métodos químicos descritos, existe otro modo de funcionalizar los materiales de carbono de manera no covalente y es mediante el uso de métodos electroquímicos. Así, se puede lograr el crecimiento de películas delgadas sobre la superficie del nanomaterial a través de la electropolimerización de un monómero [Gao, 2000; Chen, 2001b]. Aunque el polímero formado interacciona de manera no covalente con la superficie de carbono, es posible que se produzca en parte una unión covalente por reacción con los grupos funcionales existentes en la superficie [Bleda-Martínez, 2007]. Un ejemplo de este tipo de modificación de la superficie es la electropolimerización de polianilina sobre fibras de carbón activado [Salinas-Torres, 2013].

### **1.2.5.2 Métodos de funcionalización covalente**

La funcionalización covalente se basa en la formación de enlaces covalentes entre los compuestos funcionales y los átomos de carbono, tanto de los bordes o extremos abiertos de los nanotubos como del plano basal de las superficies de carbono. Como se ha comentado, la reactividad del plano basal depende en gran medida de la presencia de defectos, por lo que una posible estrategia para la funcionalización covalente de los materiales de carbono consiste en la introducción de defectos en su superficie. Estos defectos se pueden crear mediante procesos oxidativos con ácidos fuertes, como  $HNO_3$  o  $H_2SO_4$  [Esumi, 1996], o con oxidantes fuertes como  $KMnO_4$  [Yu, 1998], ozono [Sham, 2006] o plasma reactivo [Ávila-Orta, 2009] o también mediante el uso de moléculas con una alta reactividad química, como el flúor [Touhara, 2002]. La idea es crear grupos funcionales en la superficie de carbono, que pueden ser precursores de otras reacciones químicas.

La modificación de la superficie de los nanomateriales de carbono también se ha llevado a cabo mediante activación fotoquímica. Así, a través de la irradiación de luz UV se han conseguido anclar moléculas de tetraóxido de osmio a la superficie de nanotubos de carbono [Cui, 2003] y grupos fenilo a la superficie del grafeno, por reacción con peróxido de benzoilo [Liu, 2009c].

Al igual que en el caso de la funcionalización no covalente, es posible utilizar técnicas electroquímicas como herramienta para lograr la funcionalización covalente de las nanoestructuras de carbono de manera rápida y eficiente. Por ejemplo, la aplicación de una corriente provoca la aparición de defectos estructurales y grupos oxigenados, a partir de los cuales se pueden introducir nuevas funcionalidades [Moraitis, 2011].

Dentro de la funcionalización asistida mediante técnicas electroquímicas, un método muy eficaz para la funcionalización covalente de las superficies de carbono es el proceso de electroinjerto, que ya ha sido descrito en esta introducción. Este proceso permite incorporar un gran número de grupos funcionales a la estructura de los nanomateriales de carbono, obteniéndose así nanomateriales con diferentes propiedades. El electroinjerto puede llevarse a cabo mediante reducción de sales de diazonio [Xia, 2016] o compuestos vinílicos [Defever, 2006].

La gran variedad de métodos disponibles para la funcionalización, tanto covalente como no covalente, de los nanomateriales de carbono permite incorporar un número casi ilimitado de funcionalidades en la superficie de estos, de manera que se amplía enormemente el alcance de sus aplicaciones.

### **I.3. Electroodos modificados con biomoléculas. Biosensores**

En la definición de biosensor electroquímico proporcionada para la IUPAC se establece que es un dispositivo capaz de proporcionar información analítica específica, de manera cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que se encuentra en contacto directo con un transductor electroquímico [Thévenot, 2001]. Este elemento de reconocimiento biológico aporta al sensor la selectividad necesaria para su utilización en matrices complejas, sin que sea necesario realizar procesos previos de separación. El desarrollo de los biosensores está ligado a la evolución de la biología molecular y de las técnicas de

análisis instrumental, lo que ha supuesto una mejora en el diseño de los sistemas, obteniéndose biosensores sencillos, miniaturizables, de menor coste y mayor aplicabilidad. Esto ha hecho posible el desarrollo de biosensores para un gran número de aplicaciones dentro del campo clínico, industrial, medioambiental y alimentario [Wang, 2004b].

La clasificación de los biosensores puede realizarse de acuerdo a diferentes criterios. Así, en función del tipo de interacción entre el elemento de biorreconocimiento y el analito, se pueden clasificar en biosensores catalíticos y biosensores de afinidad [Thévenot, 2001]. Los biosensores catalíticos se basan en una reacción catalizada por una macromolécula que actúa como biocatalizador. Los biocatalizadores más comúnmente utilizados son las enzimas, microorganismos o tejidos. Los biosensores de afinidad se basan en la interacción entre el analito y el biorreceptor. Entre estos biosensores se encuentran los biosensores de ADN.

### **1.3.1 Biosensores enzimáticos**

Las enzimas son biocatalizadores naturales de naturaleza proteica. Presentan alta eficiencia catalítica y elevada selectividad, lo que las convierte en unos catalizadores muy sofisticados. En una reacción catalizada por una enzima, la unión del sustrato a la enzima se produce en una región concreta de la misma denominada centro activo. Una vez formado el producto, la enzima se regenera de manera que es posible comenzar nuevamente el ciclo de reacción. Para ello, en ocasiones, es necesaria la presencia de cofactores.

Las enzimas se utilizan habitualmente como elemento de biorreconocimiento en el desarrollo de biosensores, ya que, además de su elevada selectividad y sensibilidad, presentan otras múltiples ventajas, como capacidad de autorregeneración, gran variedad de enzimas disponibles, rápida respuesta, posibilidad de monitorización continua y capacidad de detectar tóxicos por inhibición de su actividad catalítica, entre otras.

Entre las enzimas más empleadas destacan las oxidorreductasas, que catalizan reacciones de oxidación o reducción [Mello, 2002]. Este tipo de enzimas tiene un especial interés en la construcción de biosensores amperométricos, ya que en la

transformación enzimática del sustrato tiene lugar una transferencia de electrones. Dentro de este grupo se encuentran las enzimas oxidasas, que utilizan el oxígeno molecular como aceptor de electrones en el ciclo catalítico.

### I.3.1.1 Biosensores basados en la enzima lactato oxidasa

La enzima lactato oxidasa (LOx) proveniente de *Pediococcus* sp. (figura I.7) cataliza la oxidación de lactato a piruvato y peróxido de hidrógeno. Perteneció a la familia de las flavoenzimas ( $\alpha$ -hidroxiácido oxidasa), es decir, incorpora un cofactor de tipo flavina fuertemente enlazado en su estructura. La interacción de este cofactor, el flavín mononucleótido (FMN), con el sustrato es la responsable de la gran especificidad de esta enzima por el lactato [Umena, 2006]. Estructuralmente, está formada por dos tetrámeros compactamente empaquetados en una unidad asimétrica [Leiros, 2006]. Cada tetrámero forma una unidad biológicamente activa y tiene un peso molecular de 160 kDa.

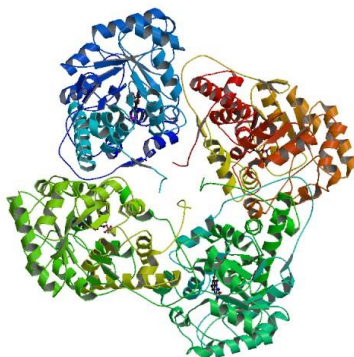


Fig. I.7. Estructura de la enzima lactato oxidasa.

La determinación de la concentración de lactato es de gran importancia en diferentes ámbitos, como el clínico, el agroalimentario o la medicina deportiva. La concentración de lactato en sangre en individuos sanos en reposo se encuentra entre 0.5 y 1.5 mM y puede aumentar hasta 12.0 mM durante el ejercicio [Stanley, 1985]. Bajo condiciones de ejercicio excesivo el nivel de lactato puede superar la capacidad de tamponamiento de las células, resultando en acidosis láctica, que puede afectar al

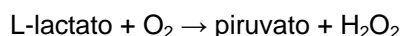


funcionamiento de los músculos [Kemp, 2005]. Esto se conoce en medicina deportiva como el umbral láctico y es un indicador del nivel de entrenamiento de un atleta [Kemp, 2005]. De manera similar, el nivel de lactato en sangre se utiliza como indicador en el diagnóstico de pacientes en procesos de cuidados intensivos y operaciones quirúrgicas, ya que está relacionado con la presencia de diferentes patologías como choque cardiogénico [Karlsson, 1975], fallo respiratorio [De Backer, 1997] o enfermedades hepáticas [Kruse, 1987], entre otras.

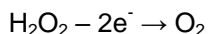
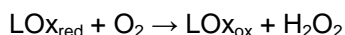
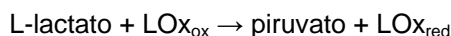
Por otro lado, la fermentación láctica es un proceso importante en la industria alimentaria. Los niveles de lactato indican la estabilidad, frescura y calidad de muchos productos lácteos, como leche, yogur o cremas, así como de carne, frutas y vegetales [Przybyt, 2014]. Además, en la producción de vino, la fermentación maloláctica, llevada a cabo por las bacterias presentes en las uvas y en el mosto, tiene lugar tras la fermentación alcohólica y convierte el ácido málico en ácido láctico, reduciendo la acidez del vino y produciendo una mejora en el sabor del producto final. Por este motivo, en el control de calidad de los vinos es importante la monitorización de los niveles de ácidos láctico y málico presentes en el vino joven [Przybyt, 2014].

Entre los métodos analíticos convencionales para la determinación de lactato destacan el análisis cromatográfico y el ensayo colorimétrico [Madrid, 1999]. Sin embargo, estos métodos son largos y complejos debido al proceso de pretratamiento de la muestra y la preparación de reactivos, por lo que el desarrollo de biosensores para la determinación de este analito es de gran interés por las ventajas que ofrecen estos dispositivos. Concretamente, los biosensores amperométricos basados en reacciones enzimáticas suponen una mejora en cuanto a especificidad, selectividad, respuesta, tamaño y reproducibilidad [Foster, 2000; Vidal, 2003; Qiaocui, 2005; Zhou, 2006], ya que se combina la sensibilidad de las técnicas electroquímicas con la elevada selectividad proporcionada por la unión específica enzima-sustrato [Suman, 2005].

La determinación de lactato mediante el uso de la enzima lactato oxidasa (LOx) se basa en la conversión de ácido láctico en ácido pirúvico en presencia de oxígeno, según la reacción:



En los biosensores amperométricos desarrollados utilizando esta enzima, la detección de lactato se lleva a cabo típicamente mediante la monitorización del consumo de  $O_2$  [Makovos, 1985] o de la producción de  $H_2O_2$  [Lamas-Ardizana, 2014; Loaiza, 2015]. En estas condiciones, el  $O_2$  actúa como mediador natural en la detección electroquímica de lactato, según las reacciones:



Tras la oxidación del sustrato y reducción de la enzima, el  $O_2$  actúa como aceptor natural de electrones y regenera la enzima produciendo  $H_2O_2$ , que se oxida sobre el electrodo. La corriente anódica producida es proporcional a la cantidad de  $H_2O_2$  producido y, por tanto, a la concentración de lactato presente en la muestra. En el caso del consumo de  $O_2$  este es directamente proporcional a la cantidad de lactato transformado. Sin embargo, tanto la reducción de  $O_2$ , como la oxidación de  $H_2O_2$  requieren sobrepotenciales muy elevados, lo que conlleva serios problemas de interferentes.

Con el objeto de minimizar la contribución de las sustancias interferentes en la respuesta del biosensor se han descrito diferentes metodologías para reducir el sobrepotencial impuesto al sistema biosensor, tales como el uso de compuestos electrocatalizadores, como el azul de Prusia [Liu, 1997], o la ftalocianina de cobalto [Iwuoha, 1999]; aumento de la sensibilidad mediante la coinmovilización de peroxidasa de rábano y lactato oxidasa [Pérez, 2012; Yang, 2012a]; aumento del área efectiva del electrodo por modificación con nanomateriales como nanotubos de carbono [Goran, 2011], nanopartículas de oro [Gamero, 2010] o de platino [Yu, 2013]; o sustitución del aceptor natural de electrones ( $O_2$ ) por un mediador redox.

Esta última estrategia es la utilizada en los llamados biosensores electroquímicos de segunda generación, que utilizan mediadores de transferencia de carga para facilitar el paso de los electrones desde la enzima hasta la superficie del electrodo. En este caso, la regeneración de la enzima tras ser reducida al oxidar el lactato se produce a través del mediador redox. Posteriormente, el mediador se regenera sobre la

superficie del electrodo mediante una reacción electroquímica, como se muestra en el esquema de la figura I.8. Así, los mediadores artificiales actúan como aceptor de electrones en lugar del oxígeno molecular y transfieren los electrones desde la forma reducida de la enzima al electrodo. De esta manera, el potencial de trabajo del electrodo corresponde al potencial formal del mediador, reduciendo así el sobrepotencial necesario para la determinación de lactato.

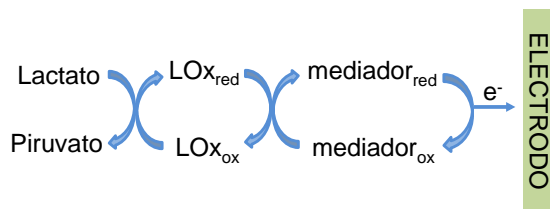


Fig. I.8. Esquema del proceso de regeneración de la enzima mediante el uso de un mediador redox.

Entre los mediadores utilizados en el desarrollo de biosensores basados en la enzima lactato oxidasa se ha descrito el uso de polímeros conductores, como el polipirrol [Khan, 1997], poli(pirrol)-poli(vinilsulfonato) o poli(vinilpirrolidona) [Kenausis, 1996]; complejos de metales de transición, como complejos de osmio [Park, 1997] o derivados del ferroceno [Parra, 2006b; Boujtita, 1996]; o colorantes orgánicos como verde de metileno [Kulys, 1993], azul de Meldola [Pereira, 2011], tetratiofulvaleno [Marzouk, 1997] o grupos quinona [Haccoun, 2004]. La desventaja de estos dispositivos es la necesidad de tener que añadir el mediador a la disolución. El diseño de sistemas compactos que incorporen el mediador redox supone una gran ventaja.

Por todo ello, debido a la importancia de este analito, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos dispositivos biosensores para la determinación de lactato, que permitan mejorar las propiedades analíticas de los biosensores descritos en la bibliografía, especialmente, en términos de sensibilidad y estabilidad.

### I.3.2 Biosensores electroquímicos de ADN

Los métodos para la identificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos atraen un gran interés debido a la creciente necesidad de identificar microorganismos

patógenos en diferentes matrices, como agua y alimentos, además de estudiar enfermedades humanas provocadas por mutaciones genéticas. El descubrimiento de las secuencias genómicas tanto de esos patógenos como humanas ha resultado de gran utilidad en el estudio de los factores causantes de determinadas enfermedades. La detección de secuencias específicas de ADN puede ser empleada en el diagnóstico clínico de enfermedades genéticas hereditarias, en el estudio de los patógenos y de sus enfermedades asociadas. Entre los diferentes tipos de enfermedades genéticas causadas por alteraciones en la secuencia de ADN el mayor reto lo supone la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Un polimorfismo de un solo nucleótido es una variación en una sola base nitrogenada en una secuencia de ADN en el genoma de diferentes miembros de una especie biológica o entre un par de cromosomas en un individuo [Raven, 2017]. Esta mutación es consecuencia de un error en la replicación y puede ser la causa directa de una enfermedad o de la predisposición de un individuo a sufrir determinadas patologías. Por tanto, el reconocimiento de secuencias específicas de ADN y la detección de los polimorfismos de un solo nucleótido son importantes para el diagnóstico temprano de enfermedades genéticas, así como para el diseño de productos farmacéuticos, seguridad alimentaria o protección ambiental [He, 2005].

Los métodos convencionales de análisis de ADN están basados en la secuenciación de las cadenas de ADN marcadas radiactivamente. La secuenciación es un proceso complejo, que requiere largos tiempos de análisis, además de las limitaciones que presenta en cuanto a seguridad para el operador y para el medioambiente. Por ello, es de gran interés el desarrollo de dispositivos que permitan la detección de secuencias de ADN de forma rápida, sencilla, barata y segura.

Con el fin de satisfacer esta demanda surgen los biosensores de ADN. Estos se basan en la hibridación de secuencias de ADN, que presenta una alta especificidad. Como elemento de reconocimiento biológico se utiliza una secuencia de ADN de cadena sencilla denominada sonda, complementaria en mayor o menor medida con la secuencia que se pretende determinar, denominada secuencia analito. El biosensor de ADN debe ser capaz de proporcionar una señal analítica que permita determinar si se ha producido la hibridación entre la sonda y la secuencia analito y, además,

cuantificar la magnitud del proceso de biorreconocimiento. Esta señal puede ser eléctrica, óptica, térmica o piezoeléctrica [Kavita, 2017]. Los biosensores electroquímicos presentan la ventaja de generar una señal analítica directa y, además, son fácilmente miniaturizables, por lo que son muy utilizados.

El desarrollo de un biosensor electroquímico de ADN incluye las etapas que a continuación se describen.

1. Inmovilización de la sonda
2. Hibridación con la secuencia analito
3. Detección electroquímica del evento de hibridación

### **1.3.2.1 Inmovilización de la sonda de ADN**

El proceso de inmovilización de la sonda tiene una especial importancia en la construcción de biosensores de ADN, ya que de ella dependen la sensibilidad y selectividad del biosensor. La orientación de la sonda sobre el electrodo, así como su accesibilidad y estabilidad, necesarias para que la eficiencia del evento de hibridación sea lo mayor posible, dependen en gran medida del control de la superficie y el recubrimiento. Además, con el objeto de optimizar la selectividad del biosensor es importante minimizar la adsorción inespecífica a la superficie del electrodo.

Se han descrito numerosos métodos de inmovilización de la sonda sobre diferentes tipos de electrodos, tales como adsorción [Jahanbani, 2016; Wang, 1998; del Pozo, 2005a], electrodeposición [Oliveira, 2015], formación de monocapas autoensambladas de sondas modificadas con un grupo tiol [García-Mendiola, 2016; Nakayama, 2002; Peng, 2006; Steel, 1998], formación de un enlace covalente, que puede ser mediante sales de diazonio [Revenga-Parra, 2014] o por formación de enlace entre una amina y un ácido carboxílico [Cai, 2003b; Popovich, 2002], mediante interacción entre avidina y biotina [Chung, 2011; Hernández-Santos, 2004; Huang, 2002], inmovilización en polímeros conductores [Rahman, 2015; Komarova, 2005; Thompson, 2003], en membranas bilipídicas [Zhou, 2008; Fajkus, 2002] o por inclusión en pasta de carbono [Wang, 1998].

Entre todos estos métodos, los basados en la formación de un enlace covalente, en la quimisorción de tioles o en la interacción entre avidina y biotina permiten obtener

electrodos modificados con ADN ordenados y controlados. Además, mediante la utilización de estos métodos se puede conseguir una disposición vertical de la sonda inmovilizada, lo que, en principio, debería favorecer la hibridación al aumentar la accesibilidad a la sonda. Sin embargo, estos métodos requieren la modificación química de la sonda de ADN en el extremo 5' con un grupo funcional (tiol o amina) o con biotina para conseguir la unión deseada.

La adsorción directa sobre la superficie del electrodo es el método más sencillo de inmovilización de la sonda. Este método permite la utilización de cadenas de ADN no modificadas, sin embargo, se ha de utilizar de forma que permita el control de la disposición de sonda a fin de que mantenga la capacidad de biorreconocimiento. La modificación de la superficie con nanoestructuras puede conseguir este efecto, favoreciendo la orientación de la sonda sobre el electrodo nanoestructurado.

### **1.3.2.2 Hibridación con la secuencia complementaria**

Una vez inmovilizada la sonda, la siguiente etapa consiste en la hibridación de esta con su cadena complementaria. Los biosensores de ADN utilizan como evento de biorreconocimiento esta hibridación, que es el proceso por el que se unen dos cadenas de nucleótidos por reconocimiento de complementariedad entre su secuencia de bases nitrogenadas. La unión entre los pares de bases se produce mediante enlaces de hidrógeno. Así, adenina (A) y timina (T) son bases complementarias entre sí, que se unen mediante dos enlaces de hidrógeno, al igual que lo son citosina (C) y guanina (G), que se unen mediante tres enlaces de hidrógeno. Esta complementariedad entre las bases proporciona la gran especificidad que presentan los biosensores de ADN.

Una característica que presenta la reacción de hibridación es que es una reacción reversible. La doble hélice de ADN puede separarse en dos cadenas sencillas por desnaturalización en determinadas condiciones del medio de reacción, tales como temperatura, pH o la presencia de agentes desnaturalizantes. De manera muy interesante, al restablecerse las condiciones originales las cadenas vuelven a unirse de nuevo formando la doble cadena.

La especificidad derivada de la complementariedad de las bases y la reversibilidad de la reacción son dos propiedades de la reacción de hibridación muy útiles para su aplicación en el desarrollo de dispositivos analíticos.

### **1.3.2.3 Detección electroquímica del evento de hibridación**

La detección del evento de hibridación mediante métodos electroquímicos puede realizarse directa o indirectamente, es decir, utilizando o no secuencias marcadas o indicadores.

Los métodos directos se basan en la electroactividad intrínseca de las bases nitrogenadas [Ahour, 2017; Ozkan-Ariksoysal, 2017; Kara, 2002; Lucarelli, 2002] o en el cambio en las propiedades eléctricas de la interfase entre el electrodo y la disolución al modificarlo con el ADN [Ensafi, 2011; Wang, 2017; Cai, 2003a].

Los métodos indirectos, en cambio, se basan en el uso de cadenas marcadas, bien con enzimas [Kim, 2003; Suye, 2005], bien con nanopartículas [Rasheed, 2014; Zheng, 2014; Merkoçi, 2005; Zhu, 2003]; o en el uso de indicadores electroquímicos [García-Mendiola, 2016; García, 2008b; Shi, 2014; del Pozo, 2005b; Erdem, 2001; Millan, 1993]. De entre estos métodos, los más utilizados son la detección directa mediante la señal electroquímica generada por las bases nitrogenadas y la detección indirecta mediante el uso de indicadores electroactivos. Este segundo método presenta la ventaja de ofrecer una mayor especificidad.

Por ello, ha habido un gran interés en la búsqueda de indicadores electroquímicos, es decir, moléculas que presentan la capacidad de unirse preferentemente al ADN de cadena doble. Millan y Mikkelsen describieron por primera vez el uso de un indicador de este tipo, el complejo  $[\text{Co}(\text{fenantrolina})_3]^{3+}$ , para detectar la hibridación del ADN [Millan, 1993]. En este tipo de biosensores de ADN, tras la inmovilización de la sonda, se hace interaccionar al indicador electroquímico con el electrodo modificado con ADN antes y después de la hibridación con la secuencia analito y la magnitud de la interacción se evalúa a partir de la señal del indicador [Ferapontova, 2011]. Un buen indicador electroquímico debe permitir discriminar entre ADN de cadena doble y sencilla, consiguiéndose así una detección selectiva y sensible de las secuencias de ADN analito.

Los indicadores pueden interaccionar con el ADN de distintas formas: interacción electrostática, interacción a través de los surcos e intercalación, aunque en muchos casos la interacción se produce de un modo combinado, especialmente las moléculas cargadas que, además, pueden unirse a través de los surcos o por intercalación.

La interacción electrostática se produce por la atracción o repulsión entre una molécula cargada y el esqueleto del ADN, que contiene grupos fosfato que están cargados negativamente. Este tipo de interacción se da en mayor extensión con la cadena doble que con la cadena sencilla, aunque no es selectiva, por lo que es la interacción menos específica. Además, depende fuertemente de la fuerza iónica y el pH de la disolución. Como indicadores electroquímicos que presentan interacción electrostática con el ADN se han utilizado complejos metálicos como el hexaamín rutenio (III),  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  [Wang, 1996b], o el  $[\text{Co}(\text{fenantrolina})_3]^{3+}$  [Millan, 1993] o compuestos orgánicos como la adriamicina [Shi, 2014].

La interacción a través de los surcos se produce por la unión de moléculas pequeñas a los surcos de la doble hélice del ADN a través de enlaces de hidrógeno o interacciones de van der Waals o electrostáticas. Entre las moléculas que presentan interacción con el ADN a través de los surcos y que se ha descrito su uso como indicador electroquímico del evento de hibridación se encuentran el colorante Hoechst 33258 [Hashimoto, 1994; Hashimoto, 1998] y los ligandos N,N'-bis(2,5-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (2,5-DHS) y N,N'-bis(3,4-dihidroxibenciliden) -1,2-diaminobenceno (3,4-DHS) [Revenga-Parra, 2007].

La interacción por intercalación es la más selectiva y se produce por la inserción de una molécula entre los pares de bases adyacentes en la doble cadena de ADN. Los intercaladores suelen ser moléculas ricas en grupos aromáticos y, por lo tanto, planas, que se intercalan en una posición aproximadamente perpendicular a la doble hélice. El intercalador más conocido es el bromuro de etidio, que se ha utilizado extensamente como revelador en electroforesis en gel para estudiar secuencias de ADN [Liu, 1996; Castro, 2014]. Entre los indicadores electroquímicos que se intercalan se encuentran moléculas orgánicas, como la daunomicina [Marrazza, 1999], la doxorubicina [Ting, 2009], el naranja de acridina [Kapuscinski, 1983], ferrocenilnaftaleno [Yamashita, 2002], viológeno [Pang, 2000], safranina [García-Mendiola, 2016] o azul de metileno [Kelley, 1999; Kelley, 1997], o complejos metálicos con ligandos planares, como  $[\text{Co}(\text{bipiridina})_3]^{3+}$



[Millan, 1994],  $[\text{Os}(2,2'\text{-bipiridil})_2(1,10\text{-fenantrolina-5,6-diona})]^{3+/2+}$  o  $[\text{Os}(1,10\text{-fenantrolin})_2(1,10\text{-fenantrolina-5,6-diona})]^{3+/2+}$  [del Pozo, 2005b],  $[\text{Ru}(3\text{-(2-fenantren-9-il-vinil)-piridina})]$  [García, 2008a] o poli(4-vinilpiridina)- $[\text{Os}(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})_2\text{Cl}]^{2+}$  [Liu, 2004], entre otros.

En todos los casos, la diferencia en la respuesta electroquímica del indicador al interaccionar con el ADN de cadena sencilla o doble permite discriminar entre ambos. Esta diferencia puede manifestarse como un desplazamiento del potencial formal del indicador electroquímico o a un cambio en la intensidad corriente [Ferapontova, 2011]. Por tanto, a la hora de elegir el indicador electroquímico para el análisis de ADN se deben tener en cuenta la especificidad en su interacción con el ADN, el valor del potencial redox, la reversibilidad del proceso redox y, además, la eficiencia de la transferencia electrónica entre el electrodo y el indicador redox. Estos factores van a influir en las propiedades analíticas del biosensor de ADN, por lo que la búsqueda de nuevos indicadores electroactivos que ofrezcan una mejor respuesta tiene un gran interés en el desarrollo de dispositivos biosensores con mayor sensibilidad y selectividad.

## **1.4 Aplicación analítica de los electrodos modificados**

Teniendo en cuenta las necesidades analíticas actuales, el objetivo de esta tesis doctoral consiste en el desarrollo de nuevos métodos de análisis para la determinación de analitos de interés clínico, agroalimentario y medioambiental. La investigación se ha centrado en la construcción de dispositivos sensores y biosensores electroquímicos sensibles, estables y robustos para la determinación de hidrazina, NADH, peróxido de hidrógeno y lactato.

En el desarrollo de estos dispositivos se han utilizado nanomateriales funcionalizados con el fin de mejorar las propiedades analíticas de los sistemas sensores y biosensores gracias a las propiedades combinadas que presentan los nanomateriales intrínsecamente y las que aportan las funcionalidades incluidas en ellos a través de la funcionalización. Esto permite obtener una mayor sensibilidad y selectividad, además de estabilidad y reproducibilidad.

Debido al gran interés que despierta esta línea de investigación, existe una amplia bibliografía sobre este tema. A modo de ejemplo, en las tablas siguientes se presentan algunos sensores (tabla I.1) y biosensores (tabla I.2) construidos mediante modificación de electrodos con nanomateriales funcionalizados desarrollados en los últimos años.

Tabla I.1. Sensores químicos basados en electrodos modificados con nanomateriales funcionalizados.

nanomaterial	electrodo	modificación	analito	técnica	referencia
rGO/polIDAN	platino	adsorción	Pb <sup>2+</sup>	SWASV	[Nguyen, 2016a]
rGO/PANI	FTO	electrodeposición	hidrazina	LSV	[Ameen, 2012]
rGO/PSS	GCE	adsorción	hidrazina	cronoamperometría	[Wang, 2010]
GO/CuTPP	membrana de PVC	atrapamiento	salicilato	potenciometría	[Poursaberi, 2012]
GO/PANI y tirosinasa	GCE	adsorción	fenol	CV	[Chen, 2013b]
rGO/ZnO	GCE	electrodeposición	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cronoamperometría	[Palanisamy, 2012]
rGO/FeNPs	GCE	adsorción	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cronoamperometría	[Amanulla, 2017]
rGO/poli-azul de metileno	grafito	electrodeposición	nitrito	CV	[Erçarkci, 2014]
rGO/PAH	CSPE	adsorción	NADH	DPV	[Istrate, 2016]
GO/azure A	oro	enlace covalente	NADH	cronoamperometría	[Gómez-Anquela, 2014]
GO/hemina	GC	adsorción	AA, DA, UA	DPV	[Zou, 2015]

DAN: 1,5-diaminonafthaleno; SWASV: voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada; PANI: polianilina; FTO: óxido de estaño fluorado; LSV: voltamperometría de barrido lineal; GCE: electrodo de carbón vítreo; PSS: sulfonato de poliestireno; CuTPP: Cu(II)–5-4 (aminofenil)–10,15,20-trifenil porfirina; PVC: cloruro de polivinilo; CV: voltamperometría cíclica; FeNPs: nanopartículas de hierro; PAH: hidroccloruro de polialilamina; CSPE: electrodo serigrafado de carbono; DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; AA: ácido ascórbico; DA: dopamina; UA: ácido úrico

Tabla I.1. Sensores químicos basados en electrodos modificados con nanomateriales funcionalizados. (cont.)

nanomaterial	electrodo	modificación	analito	técnica	referencia
AuNPs/p-aminotiofenol	oro	electrodeposición	17β-estradiol	LSV	[Florea, 2015]
AuNPs/poliDTYB	MWCNTs/GCE	adsorción	hidrazina	CV	[Fakhari, 2015]
AuNPs/3,4-DHS	CSPE	electrodeposición	NADH	CV	[Abad, 2011]
AuNPs/ibuprofeno	GCE	adsorción	azul de metileno	DPV	[Hassan, 2015]
AuNPs/FeIIIMPIX y MPBA	GCE	adsorción	glucosa	DPV	[Gu, 2017]
AuNPs/SWCNTs/SH-β-CD	GCE	adsorción	metilparatión	SWV	[Fu, 2015]
MWCNTs/metformina y AgNPs	GCE	adsorción	glucosa	cronoamperometría	[Baghayeri, 2016]
MWCNTs/[RhL]PF <sub>6</sub>	GCE	adsorción	nitrito	cronoamperometría	[Hallaj, 2016]
MWCNTs/ácido 4-aminobenzoico	pasta de carbono	atrapamiento	L-tirosina	cronoamperometría	[D'Souza, 2016]
MWCNTs/β-ciclodextrina	GCE	adsorción	ácido úrico	cronoamperometría	[Wayu, 2017]

DTYB: 4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-ilsulfanil-3-metil-1,2-bencenodiol; FeIIIMPIX: metaloporfirina; MPBA: ácido 4-mercaptofenilborónico; AgNPs: nanopartículas de plata; SH-β-CD: mono-6-tio-β-ciclodextrina; SWV: voltamperometría de onda cuadrada; L: (piridin-2-il-2-fenil)2(fen-diona)

Tabla I.2. Biosensores químicos basados en electrodos modificados con nanomateriales funcionalizados.

nanomaterial	elemento biológico	electrodo	modificación	analito	técnica	referencia
rGO/PCCOOH	antigliadina	GCE	adsorción	gliadina	DPV	[Chekin, 2016]
rGO/trietilentetramina	GOx	oro	enlace covalente	glucosa	cronoamperometría	[Ren, 2016]
GO/ferroceno	ChOx/ChEt	CSPE	adsorción	colesterol	cronoamperometría	[Dey, 2013]
rGO/fenotiazona	GDH	GCE	adsorción	glucosa	cronoamperometría	[Ravenna, 2015]
AuNPs/AMPPH	anti-HlgG	GCE	atrapamiento	HlgG	DPV	[Li, 2014]
AuNPs/ácido tióctico	ADH	CSPE	adsorción	etanol	DPV	[Gómez-Anquela, 2015]
AuNPs/p-aminotiofenol	GOx	oro	electrodeposición	glucosa	amperometría	[Azak, 2016]
AuNPs/cistamina	tirosina	GCE	adsorción	catecol	cronoamperometría	[Campanhã Vicentini, 2016]
MWCNTs/QDs	GDH	GCE	adsorción	glucosa	CV	[Ertok, 2016]
MWCNTs/[Ru(L <sub>2</sub> )(PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> ]	GDH	GCE	adsorción	glucosa	cronoamperometría	[Reuillard, 2014]
MWCNTs/IgG	anti-TGF	CSPE	adsorción	citocina TGF	amperometría	[Sanchez-Tirado, 2016]
SWCNTs/politirosina	ADH	GCE	adsorción	etanol	cronoamperometría	[Eguílaz, 2016]

PCCOOH: ácido 1-pirenocarboxílico ; GOx: glucosa oxidasa; ChOx: colesterol oxidasa; ChEt: colesterol esterasa; GDH: glucosa deshidrogenasa; AMPPH: hexafluorofosfato de 4-amino-1-(3-mercaptopropil)-piridina; HlgG: inmunoglobulina G humana; ADH: alcohol deshidrogenasa; QDs: puntos cuánticos (ZnS-CdS); L<sub>2</sub>: (fendiona)<sub>2</sub> (4-metil-4'-butilpirrol-2,2'-bipiridina); TGF: factor de crecimiento transformante

Entre los analitos estudiados se encuentra el NADH, que es un cofactor asociado a enzimas deshidrogenasas y cuya cuantificación permite la cuantificación indirecta de los sustratos enzimáticos. También se ha determinado hidrazina, que es un analito de interés medioambiental utilizado en una gran variedad de procesos industriales y que es un compuesto tóxico, incluso cancerígeno. Asimismo se ha desarrollado un sensor para la determinación de peróxido de hidrógeno, que es un compuesto de gran interés en el desarrollo de celdas de combustible y además, es un subproducto de reacciones enzimáticas catalizadas por enzimas oxidasas.

Por otro lado, se ha desarrollado un biosensor enzimático para la determinación de lactato. La importancia de este analito tiene interés en ámbitos tan diferentes como el clínico, la medicina deportiva o en control de calidad agroalimentaria.

Finalmente, en el presente trabajo se ha desarrollado un biosensor electroquímico de ADN que permite la detección de secuencias específicas y de alteraciones en una sola base en secuencias de ADN cortas como la de la bacteria *Helicobacter pylori*. Esta bacteria es causante de enfermedades gástricas e incluso cáncer y la presencia de mutaciones la convierte en resistente a determinados antibióticos.

La aplicabilidad del dispositivo desarrollado a la detección de alteraciones de una sola base en secuencias largas, de más de 100 pares de bases, se ha demostrado mediante su aplicación en la detección de mutaciones en el gen CFTR asociadas a la fibrosis quística, en muestras reales amplificadas por PCR.

La determinación de todos los analitos estudiados tiene una gran importancia y, por ello, existe un gran interés en la búsqueda de nuevos métodos que permitan su análisis de manera rápida y sencilla. En este sentido, los (bio)sensores desarrollados en este trabajo se plantean como métodos competitivos para lograr este objetivo, especialmente en el caso de los biosensores de ADN para la determinación de mutaciones genéticas directamente en muestras reales, que suponen un método alternativo y mucho más sencillo y económico que los actualmente utilizados (secuenciación del gen) y comparable en prestaciones a los métodos de cribado que se utilizan actualmente como la temperatura de desnaturalización de alta resolución (HRM) [Audrezet, 2008].

## Objetivos

---



El objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo de dispositivos sensores y biosensores electroquímicos mediante la modificación de las superficies electródicas con nanomateriales funcionalizados, que mejoren las propiedades analíticas de estos sistemas. Para ello se emplearán diferentes nanomateriales sobre los que se incluirán las funcionalidades deseadas a través de la funcionalización.

Para la consecución del objetivo general se plantean una serie de objetivos parciales:

- Estudiar diferentes estrategias de modificación de electrodos serigrafiados con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) incluyendo el electroinjerto de sales de diazonio y caracterizar las superficies obtenidas empleando distintas técnicas analíticas.
- Modificar los electrodos nanoestructurados con N,N-bis(3,4-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHS). Caracterizar los electrodos modificados y estudiar su capacidad electrocatalítica frente a NADH e hidrazina.
- Sintetizar grafeno modificado químicamente (rGO-DHS) y nanopartículas de oro funcionalizadas (AuNPs-DHS) mediante el empleo de las propiedades reductoras del 3,4-DHS. Caracterizar los nanomateriales obtenidos mediante técnicas como espectrofotometría de absorción UV-vis y de fluorescencia o espectroscopía Raman.
- Modificar electrodos serigrafiados de carbono modificados con rGO-DHS y AuNPs-DHS y estudiar su actividad electrocatalítica frente a diferentes moléculas.
- Teniendo en cuenta las propiedades electrocatalíticas de las diferentes plataformas nanoestructuradas desarrolladas, construir y optimizar sensores para la determinación de analitos como NADH, hidrazina o peróxido de hidrógeno.
- Desarrollar dispositivos biosensores de lactato basado en la modificación de las plataformas nanoestructuradas desarrolladas con la enzima lactato oxidasa. Optimizar las condiciones de funcionamiento y aplicar a la determinación de lactato en muestras reales.
- Sintetizar nanopuntos de carbono (CDs) a partir de moléculas orgánicas sencillas y caracterizar el nanomaterial obtenido. Modificar electrodos serigrafiados de oro con los CDs sintetizados y caracterizar la superficie.



- Desarrollar un biosensor electroquímico nanoestructurado de ADN para la detección de secuencias específicas, así como de mutaciones puntuales en esas secuencias, utilizando como analito modelo una secuencia sintética de 25 bases procedente de la bacteria *Helicobacter pylori*.
- Aplicar el biosensor desarrollado en la detección de mutaciones genéticas asociadas a enfermedades, como la fibrosis quística, en muestras de ADN real de PCR extraído de células sanguíneas, utilizando para ello una secuencia de 373 bases del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística.

## Materiales y métodos

---



## M.1. Reactivos, disoluciones y dispersiones

### M.1.1 Reactivos Comerciales

Todos los reactivos comerciales utilizados en este trabajo tienen, al menos, la calidad reactivo para-análisis. Se utilizaron tal como se recibieron, sin ser sometidos a ningún proceso de purificación.

Los siguientes reactivos han sido suministrados por Sigma-Aldrich: 3,4-dihidroxibenzaldehído, o-fenilendiamina, dodecil sulfato sódico (SDS), hidróxido sódico (NaOH), fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico, acetato de sodio, carbonato y bicarbonato sódicos, ácido clorhídrico, 4-aminotiofenol (4-ATP), cloruro de hexaamín rutenio (II) ( $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ ), ferricianuro de potasio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida,  $\beta$ -nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH), sulfato de hidrazina, borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ), hidrato de hidrazina, cloruro potásico, hidrógeno tetracloroaurato ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), citrato sódico, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), lactato oxidasa (EC 232-841-6), lactato de litio, ácido tartárico, ácido ascórbico, glucosa, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), safranina, nitrato potásico ( $\text{KNO}_3$ ).

Otros reactivos han sido suministrados por Fluka: metanol, etanol, ácido acético glacial, acetato sódico, agua, ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA).

El ácido sulfúrico fue proporcionado por Merck, la dimetilfomamida, por Fisher, la fructosa y el sulfato de zinc, por Panreac y el nitrito sódico por Riedel de Haën.

Para todas las preparaciones en medio acuoso se utilizó agua purificada a través de un sistema de agua ultrapura Direct Q-3 UV de Millipore, que proporciona valores de resistividad de  $18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}^2$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Para desoxigenar las disoluciones, cuando fue necesario, se hizo pasar corriente de nitrógeno suministrado por Carbueros Metálicos, S. A.

El kit enzimático comercial para la determinación de lactato (K-LATE 07/14) se adquirió a Megazyme (Irlanda).

## **M.1.2 Reactivos sintetizados**

### **M.1.2.1 Síntesis de 3,4-dihidroxisalophen**

La síntesis de N,N'-bis(3,4-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHS) se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Revenga-Parra [Revenga-Parra, 2005]. En un matraz de 25 ml se mezclaron 1.00 mmol de o-fenilendiamina (0.1083 g) y 2.00 mmol de 3,4-dihidroxibenzaldehído (0.2765 g). La mezcla sólida se molió a temperatura ambiente hasta conseguir un sólido finamente pulverizado. Posteriormente, la mezcla se calentó hasta 45°C durante 60 minutos. Se obtuvo un sólido marrón que se recrystalizó en metanol.

### **M.1.2.2 Síntesis de nanopuntos de carbono**

Los nanopuntos de carbono se sintetizaron mediante el método descrito por Ahmed [Ahmed, 2015]. Se disolvieron 2.00 mmol de ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) (0.7610 g) en 30 mL de agua, formándose una suspensión blanca. Se añadieron 8.00 mmol de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), obteniendo así una solución incolora. Se calentó en una placa a 150 °C hasta casi sequedad donde se formó un gel amarillo pálido. Se añadió 1 mL de agua y se repitió el procedimiento 5 veces en unos 30 minutos. En ese momento se subió la temperatura a 180 °C. Se continuó calentando hasta que el gel se volvió de un color naranja rojizo. El gel se disolvió en unos 25 mL de agua, se filtró a través de un filtro de nylon de 0.45  $\mu$ m y la solución se purificó mediante diálisis a través de un tubo de diálisis (MWCO, 3.5 KDa) durante 3 días. La solución final se guardó a 4°C hasta su uso.

## **M.1.3 Disoluciones**

Las disoluciones tampón de fosfato se prepararon a partir de las especies correspondientes del sistema fosfórico-fosfato en función del pH requerido para cada una de ellas (3, 6-8). El valor del pH se ajustó con una disolución concentrada de NaOH.

La disolución tampón de acético/acetato 0.1 M a pH 5.0 se preparó a partir de ácido acético glacial y acetato sódico. El pH se ajustó con una disolución concentrada de NaOH.

Las disoluciones tampón de carbonato pH 9.4 y 11.2 se prepararon a partir de las especies carbonato y bicarbonato sódico. El valor del pH se ajustó con una disolución concentrada de NaOH.

Las disoluciones 3,4-dihidroxisalophen usadas en este trabajo (2.0 mM) se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas. Debido a la baja solubilidad del compuesto en medio acuoso, las disoluciones se prepararon en dimetilformamida.

La disolución madre de hidrazina en concentración  $1.0 \times 10^{-2}$  M se preparó a partir del reactivo sólido en el tampón de medida. Las disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución del volumen apropiado de las disoluciones madre con el tampón de medida.

Las disoluciones de NADH 1.0 mM se prepararon a partir del sólido comercial en el tampón de trabajo. Estas disoluciones se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas.

La disolución estándar de lactato  $1.0 \times 10^{-2}$  M se preparó a partir del sólido comercial en el tampón de trabajo. Esta disolución se preparó inmediatamente antes de ser utilizada.

La disolución de hidróxido sódico 0.1 M se preparó en agua bidestilada a partir del sólido comercial.

La disolución de ferrocianuro/ferricianuro potásico utilizada para las medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y CV, se preparó disolviendo la cantidad necesaria de ferrocianuro y ferricianuro potásico para una concentración 5 mM en tampón fosfato pH 7 (0.1M) conteniendo cloruro potásico (KCl) en concentración 0.1 M.

La disolución de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  5.0 mM utilizada en la optimización del número de barridos de electroinjerto de MWCNTs se preparó a partir del sólido comercial en el tampón de trabajo.

La disolución de safranina 1.0 mM utilizada como indicador electroquímico del evento de hibridación se preparó a partir del reactivo sólido en tampón fosfato.

#### **M.1.4 Dispersiones**

##### **M.1.4.1 Dispersión de nanotubos de carbono no funcionalizados de pared múltiple (MWCNTs) o funcionalizados con grupos amina (MWCNT-NH<sub>2</sub>) o con grupos carboxílicos (MWCNT-COOH)**

Se utilizaron nanotubos de carbono de pared múltiple no funcionalizados (MWCNTs), aminados (MWCNT-NH<sub>2</sub>) o carboxilados (MWCNTs-COOH), (>95% pureza de carbón y <5% de impurezas de óxidos metálicos) suministrados por Nanocyl S.A. De acuerdo con las especificaciones del fabricante su diámetro es de 9.5 nm y su longitud media es de 1 µm, con un grado de funcionalización inferior al 0.5% para los grupos amino o carboxílicos. Se prepararon dispersiones madre de 0.5 mg mL<sup>-1</sup> tanto de MWCNTs como de MWCNT-NH<sub>2</sub> en soluciones acuosas de SDS al 1% mediante sonicación durante 1 hora en un baño de ultrasonidos para conseguir la total homogeneidad de la dispersión. Antes de cada utilización se sonicó la dispersión durante 30 minutos.

##### **M.1.4.2 Dispersión de grafeno oxidado (GO)**

El grafeno utilizado se sintetizó en el grupo de investigación mediante una modificación del método de Hummers [Casero, 2012; Hummers, 1958; Xu, 2008] y se caracterizó mediante diferentes técnicas (AFM, XPS, RAMAN), confirmando así que el material es grafeno oxidado. Se preparó una suspensión de concentración 1.0 mg mL<sup>-1</sup> en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0. Previo a su utilización, la suspensión se sonicó al menos durante 30 minutos para separar los agregados formados por la interacción entre láminas de grafeno oxidado. La suspensión presenta color marrón oscuro.

#### **M.1.5 Muestras reales**

Las muestras de vino blanco, cerveza rubia tipo lager y yogur líquido probiótico se adquirieron en una tienda local.

### M.1.6 Ácidos desoxirribonucleicos (ADN)

Se utilizaron tres tipos de ácidos desoxirribonucleicos: ADN de timo de ternera, oligonucleótidos sintéticos y oligonucleótidos de muestras reales amplificados mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En todas las disoluciones de ADN se ha utilizado agua purificada a través de un sistema Direct Q-3 UV (Millipore) y esterilizada en autoclave.

#### M.1.6.1 ADN de timo de ternera

El ADN de timo de ternera de cadena doble (ds-ctADN) fue suministrado por Sigma-Aldrich. Las disoluciones madre de ds-ctADN se prepararon en concentración  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en disolución tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

La relación de absorbancias de la disolución de ADN a 260 nm y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) fue de alrededor de 1.9, lo que indica que la disolución de ADN está libre de proteína [Marmur, 1961]. Se calculó la concentración en pares de bases del ADN utilizando un coeficiente de absortividad molar a 260 nm de  $6600 \text{ M}^{-1}$  [Doty, 1955].

El ADN de timo de ternera de cadena sencilla (ss-ctADN) se obtuvo calentando a  $100^\circ\text{C}$  en baño de agua viales cerrados que contenían ds-ctADN en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 durante 30 minutos. Para prevenir la renaturalización espontánea, la reacción se detuvo por la rápida inmersión en un baño de hielo. Las muestras desnaturalizadas se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### M.1.6.2 Oligonucleótidos sintéticos

Se emplearon oligonucleótidos sintéticos de cadena corta de 25 bases y de cadena larga de 100 bases, correspondientes a parte de una secuencia de la bacteria patógena *Helicobacter pylori* y del exón 11 del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística, respectivamente. Estos oligonucleótidos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

En el caso de la cadena de *Helicobacter pylori*, además de la sonda (HP1), se utilizaron secuencias sintéticas totalmente complementarias a la sonda (HP2C), una secuencia con una sola base no complementaria o polimorfismo de un solo nucleótido



(SNP) en el centro de la cadena (HP2SM) y, como control, una secuencia no complementaria (HP2NC). Estas secuencias se encuentran recogidas en la tabla M.1.

Tabla M.1. Secuencias de oligonucleótidos sintéticos de cadena corta.

<b>Secuencias de oligonucleótidos sintéticos de 25 bases</b>		
<b>sonda</b>	5'-GCGTTCCAAAGGGCAGGATCATTGA	<b>HP1</b>
<b>complementaria</b>	5'-TCAATGATCCTGCCCTTTGGAACGC	<b>HP2C</b>
<b>SNP</b>	5'-TCAATGATCCTACCCTTTGGAAGCG	<b>HPSM</b>
<b>no complementaria</b>	5'-GACCGTCGAAGTAAAGGGTTCATA	<b>HP2NC</b>

En el caso del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística se empleó una sonda sintética (WT) de 100 bases, que corresponde a una secuencia del exón 11 de dicho gen complementaria a la secuencia de estirpe salvaje utilizada como analito. La secuencia de la sonda se recoge en la tabla M.2.

Tabla M.2. Secuencias de oligonucleótidos sintéticos de cadena larga.

<b>Secuencias de oligonucleótidos sintéticos de 100 bases</b>		
<b>sonda</b>	5'-CTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTT TGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCC	<b>WTp</b>

Las disoluciones madre de oligonucleótidos se prepararon en concentración 100 µM en tampón fosfato 10.0 mM pH 7.0 con NaCl 0.4 M. Estas disoluciones se conservaron a -20 °C en pequeñas alícuotas.

### M.1.6.3 Oligonucleótidos de muestras reales amplificados mediante PCR

Las muestras reales fueron suministradas por el grupo del Dr. Molano del Instituto de Genética Médica y Molecular de Madrid (INGEMM). El ADN genómico fue extraído de células sanguíneas de leucocitos de pacientes de fibrosis quística utilizando un kit comercial Purogene de Quiagen GmbH (Hilden, Alemania), siguiendo el

procedimiento descrito por García-Mendiola [García-Mendiola, 2014]. Las muestras de PCR son fragmentos de 373 pares de bases del exón 11 del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística de individuos sanos (WT) o pacientes que presentan una mutación (mut). Como control se utilizó una secuencia no complementaria (NC) más corta. Las secuencias de PCR utilizadas se encuentran recogidas en la tabla M.3. Todas las muestras de ADN reales amplificadas por PCR son de cadena doble. Previamente a su utilización, para obtener ADN de cadena sencilla, las muestras se desnaturalizaron mediante calentamiento a 100°C durante 30 minutos, seguido de un rápido enfriamiento en hielo. Todas las muestras se conservaron a -20 °C.

Tabla M.3. Secuencias de oligonucleótidos de muestras reales de PCR.

<b>Secuencias de oligonucleótidos de muestras reales de PCR</b>		
<b>estirpe salvaje</b>	5'-AACCGATTGAATATGGAGCCAAATATATAATTTGGGTAGTGTGAAGGGTTC ATATGCATAATCAAAAAGTTTTCACATAGTTTCTTACCTCTTCTAGTTGGCATG CTTTGATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAAGATGATAT TTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGGAAACTGAGAACAGAATGAAATT CTTCCACTGTGCTTAATTTTACCCTCTGAAGGCTCCAGTTCTCCCATATCAC CATTAGAAGTGAAGTCTGGAAATAAAACCCATCATTATTAGGTCATTATCAAAT CACGCTCAGGATTCACCTTGCCTCCAATTATCATCCTAAGCAGAAGTGATATTC	<b>WT</b>
<b>mutada</b>	5'-AACCGATTGAATATGGAGCCAAATATATAATTTGGGTAGTGTGAAGGGTTC ATATGCATAATCAAAAAGTTTTCACATAGTTTCTTACCTCTTCTAGTTGGCATG CTTTGATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCA__ATGATAT TTTCTTTAATGGTGCCAGGCATAATCCAGGAAACTGAGAACAGAATGAAATT CTTCCACTGTGCTTAATTTTACCCTCTGAAGGCTCCAGTTCTCCCATATCAC CATTAGAAGTGAAGTCTGGAAATAAAACCCATCATTATTAGGTCATTATCAAAT CACGCTCAGGATTCACCTTGCCTCCAATTATCATCCTAAGCAGAAGTGATATTC	<b>mut</b>
<b>no complementaria</b>	5'-ACAGCTGAGTGCCCTGTCCTCAGATGGGGAGGGACAGGGTCGGCCTGTAC CCCGGAGGCACCTGGGTCCATCAGAGAAGGTGCAGGTGACAGAGGCGAAGG CAGATGGGGCACTGACCCAGGAGGAGAAAGCAGCCATTGGCACT	<b>NC</b>

## **M.2. Instrumentación**

### **M.2.1 Espectrofotómetro**

Para las medidas de absorción espectrofotométrica se utilizó un espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700 de SHIMADZU dotado con un sistema de termostatación de cubetas. Se utilizaron cubetas de cuarzo con 1 cm de paso óptico.

### **M.2.2 Espectrofluorímetro**

Las medidas de emisión espectrofotométrica se realizaron en un espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian. Se utilizaron cubetas de cuarzo con 1 cm de paso óptico.

### **M.2.3 Potenciostato**

Para llevar a cabo las medidas electroquímicas se utilizó un analizador electroquímico Autolab PGSTAT302N con módulo adicional de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica FRA2 de EcoChemie con el software GPES 4.9. Se emplearon electrodos serigrafados integrados (SPE) de DropSens S.L (Oviedo, España), que incluyen un electrodo de trabajo de oro o carbono, un pseudoreferencia de plata y un contraelectrodo del mismo material que el electrodo de trabajo. Los electrodos se conectaron mediante un conector SPE de DropSens.

Para obtener el espectro de impedancia electroquímica se aplicó una onda sinusoidal de potencial de  $\pm 10$  mV de amplitud respecto al potencial de equilibrio del sistema redox (0.16 V vs. Ag) en un intervalo de frecuencias entre  $10^5$  y  $5 \times 10^{-3}$  Hz, obteniendo 100 puntos distribuidos logarítmicamente. Los espectros obtenidos se analizaron mediante el ajuste de los resultados experimentales a un circuito equivalente utilizando el software GPES 4.9.

### **M.2.4 Microscopio electrónico de barrido (SEM)**

Para las imágenes de SEM se utilizó un microscopio electrónico de barrido Philips XL30-FEG.

### **M.2.5 Microscopio de fuerzas atómicas (AFM)**

Las medidas de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se llevaron a cabo en modo dinámico utilizando un sistema Nanotec Electrónica operado a temperatura y condiciones ambientales. Las imágenes se procesaron utilizando WSxM [Horcas, 2007]. Para las medidas de AFM se utilizaron *cantilevers* comerciales Olympus Si/N con una constante de fuerza nominal de  $0.75 \text{ N M}^{-1}$ . Las superficies empleadas para estas medidas fueron sustratos de vidrio ( $1.1 \text{ cm} \times 1.1 \text{ cm}$ ) recubiertos con una capa de cromo de 1-4 nm de espesor sobre la que se encontraba depositada una capa de oro de 200-300 nm de espesor (Arrandee Co. Werther, Alemania). Antes de su uso, las superficies de oro se trataron durante 2 minutos con una llama para obtener terrazas de Au (111). Las medidas se llevaron a cabo en aire en modo de contacto intermitente.

### **M.2.6 Espectrófotometro FTIR**

Las medidas de Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) se llevaron a cabo en un espectrómetro FT-IR Bruker IFS60v equipado con un detector MCT y sistema de purga de gas para la eliminación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Whatman). Los espectros se promediaron entre 1024 barridos con una resolución espectral de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Para la sustracción del blanco y la corrección de línea base de espectros se utilizó el software OPUS de Bruker.

### **M.2.7 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)**

Las medidas de microscopía de transmisión electrónica (TEM) se realizaron en un microscopio electrónico JEOL JEM operado a 100kV. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImageJ 1.38x.

Para otras medidas se utilizó un microscopio electrónico FEG S/TEM Talos F200X, FEI.

### **M.2.8 Espectrómetro Raman**

Las medidas de Espectroscopía Raman se realizaron en el Leibniz Institute of Photonic Technology (IPHT) y en el Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller University, Jena (Alemania), utilizando diferentes espectrómetros micro-Raman WITec equipados con distintos láseres: ión Argón a 488 nm, He-Ne a 632.8 nm y diodo a 785nm. El procesamiento de datos incluye la sustracción de línea base descrita por Palacký [Palacký, 2011]. Las muestras se prepararon mediante deposición de 8 µL de una disolución de la sustancia en estudio sobre un sustrato de vidrio y secado a temperatura ambiente.

### **M.2.9 Instrumentación para dispersión de luz dinámica (DLS)**

Las medidas de Dynamic Light Scattering (DLS) se realizaron a 25°C utilizando un analizador de tamaño de partícula VASCO de Cordouan Technologies.

### **M.2.10 Instrumentación para medida del potencial Zeta**

Las medidas de potencial Zeta se llevaron a cabo a 25 °C utilizando un instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., Grovewood, Worcestershire, Reino Unido).

### **M.2.11 Instrumentación para análisis elemental**

Se utilizó un analizador elemental LECO CHNS-932, una balanza AD-4 Perkin-Elmer y una microbalanza MX5 Mettler Toledo.

### **M.3. Procedimientos experimentales**

#### **M.3.1 Pretratamiento de los electrodos**

##### **M.3.1.1 Activación de electrodos serigrafiados de carbono**

Los electrodos serigrafiados de carbono se activaron en HCl 0.1M mediante la aplicación de 10 barridos cíclicos de potencial a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  entre +0.5 y -1.0 V. A continuación, se aclararon con agua destilada.

##### **M.3.1.1 Activación de electrodos serigrafiados de oro**

Los electrodos serigrafiados de oro se activaron en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M mediante la aplicación de 10 barridos cíclicos de potencial a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  entre -0.2 y +1.2 V. A continuación, se aclararon con agua destilada.

#### **M.3.2 Modificación de electrodos con nanotubos de carbono**

##### **M.3.2.1 Modificación de electrodos serigrafiados con MWCNTs aminados mediante diazotación y electroinjerto (estrategia 1)**

100  $\mu\text{L}$  de la disolución stock de MWCNTs- $\text{NH}_2$  ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  10 mM en agua y 10  $\mu\text{L}$  de HCl 2 M. Esta mezcla se introdujo en un baño de hielo durante 10 minutos, ya que la reacción es exotérmica, con el objetivo de que la formación del diazoderivado fuera completa. Transcurrido este tiempo, se depositó sobre electrodos serigrafiados de oro (AuSPE) o carbono (CSPE) y se llevó a cabo el electroinjerto mediante la aplicación de 40 barridos cíclicos de potencial entre +0.6 V y -0.6 V a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para reducir la sal de diazonio generada *in situ*. Tras este proceso se aclararon con agua.

### **M.3.2.2 Modificación de electrodos serigrafados de oro con MWCNTs no modificados mediante diazotación y electroinjerto (estrategia 2)**

Los AuSPEs se sumergieron durante 1 hora en una disolución 1 mM de 4-aminotiofenol (4-ATP) en etanol para formar una monocapa autoensamblada sobre la superficie del oro de manera que los grupos amino queden expuestos. Posteriormente se aclararon con etanol y se secaron. Para diazotar los grupos amino, se cubrió el electrodo de trabajo con 7  $\mu\text{L}$  de una disolución al 6% de  $\text{NaNO}_2$  en  $\text{HCl}$  1 M. Se dejó reaccionar durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Una vez diazotados, los electrodos se secaron con  $\text{N}_2$  y se cubrieron con una solución que contenía 100  $\mu\text{L}$  de la disolución stock de MWCNTs ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) y 100 $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl}$  0.2 M en agua. Se aplicaron 60 barridos cíclicos entre +0.6 V y -0.6 V a  $100\text{ mV s}^{-1}$  para injertar los CNTs a la superficie y, finalmente, se aclaró con agua.

### **M.3.2.3 Modificación de electrodos serigrafados con MWCNTs por formación de un enlace triazeno (estrategia 3)**

Se sumergieron los AuSPEs durante 1 hora en una disolución 1 mM de 4-ATP en etanol. Posteriormente se aclararon con etanol y se secaron. Para diazotar los grupos amino, se cubrió el electrodo de trabajo (WE) con 7  $\mu\text{L}$  de una disolución al 6% de  $\text{NaNO}_2$  en  $\text{HCl}$  1 M. Se dejó reaccionar durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Una vez diazotados, los electrodos se secaron con  $\text{N}_2$ , se cubrió el electrodo de trabajo con 15  $\mu\text{L}$  de una solución de MWCNTs- $\text{NH}_2$   $0.25\text{ mg mL}^{-1}$  a pH 8 en  $\text{NaOH}$  y se dejó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con agua.

### **M.3.2.4 Modificación de electrodos serigrafados con MWCNTs por formación de un enlace entre aminas y ácidos carboxílicos (estrategia 4)**

Se sumergieron los AuSPEs durante 1 hora en una disolución 1 mM de 4-ATP en etanol. Posteriormente se aclararon con etanol y se secaron. Tras la modificación con 4-ATP, se mezclaron 140  $\mu\text{L}$  de agua, 20  $\mu\text{L}$  de NHS (N-hidroxisuccinimida) 10 mM, 20  $\mu\text{L}$  de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) 10 mM y 20  $\mu\text{L}$  de MWCNTs-COOH  $0.5\text{ mg mL}^{-1}$ , se agitó y se dejó reaccionar durante 1 minuto. Se

depositaron 7  $\mu\text{L}$  de la mezcla sobre el electrodo de trabajo y se dejó durante 3 horas a 4  $^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Se secó y se lavó con agua.

#### **M.3.2.5 Modificación de electrodos serigrafiados con MWCNTs por adsorción directa (estrategia 5)**

Se depositaron sobre el electrodo de trabajo 4  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:1 de la dispersión stock de CNTs-NH<sub>2</sub> y agua. Se llevó a sequedad y se lavó con agua.

#### **M.3.3 Modificación de las plataformas basadas en MWCNTs con 3,4-DHS**

Sobre los electrodos previamente modificados con MWCNTs se depositaron 3  $\mu\text{L}$  de 3,4-DHS 1 mM en metanol sobre el electrodo de trabajo. Tras la evaporación del disolvente se lavó con agua para eliminar el material débilmente adsorbido.

#### **M.3.4 Síntesis de grafeno reducido con 3,4-DHS**

La síntesis se llevó a cabo mediante la mezcla de grafeno oxidado (GO) 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 3,4-DHS 100  $\mu\text{M}$ . Esta mezcla se calentó en baño de agua a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas para permitir la reducción del grafeno. Pasado ese tiempo, la suspensión cambió de un color marrón a un color negro menos soluble.

#### **M.3.5 Reducción de grafeno oxidado con borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>)**

La reducción de GO con NaBH<sub>4</sub> se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Shin y colaboradores [Shin, 2009]. A una suspensión de GO 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se le añadió NaBH<sub>4</sub> 150 mM. La reacción, que sucede de manera violenta, se dejó proceder durante 2 horas, tras las cuales, se centrifugó la suspensión a 13000 r.p.m. durante 30 minutos y se retiró el sobrenadante.

#### **M.3.6 Reducción de grafeno oxidado con hidrazina**

La reducción se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Stankovich [Stankovich, 2007] con algunas modificaciones. En 5 mL de agua ultrapura se disolvieron 0.5 mg de GO y se dispersó mediante sonicación en un baño de



ultrasonidos. Se añadieron 12  $\mu\text{L}$  de hidrato de hidrazina (160  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la suspensión a 13000 r.p.m. durante 30 minutos y se retiró el sobrenadante.

### **M.3.7 Modificación de electrodos con grafeno reducido químicamente**

Una vez llevado a cabo el tratamiento térmico de reducción, la suspensión de grafeno y 3,4-DHS se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 40 minutos y se lavó dos veces con agua. Se retiró el sobrenadante hasta dejar un volumen de 30  $\mu\text{L}$ . Se tomaron 8  $\mu\text{L}$  del precipitado y se depositaron sobre electrodos serigrafiados de carbono (CSPE).

### **M.3.8 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando 3,4-DHS como reductor**

Las nanopartículas se sintetizaron mezclando en medio acuoso  $\text{HAuCl}_4$  200  $\mu\text{M}$  y 3,4-DHS 100  $\mu\text{M}$ . Esta mezcla se dejó reaccionar durante 24 horas protegida de la luz. Una vez formadas las nanopartículas (AuNPs-DHS) se purificaron mediante centrifugación a 9000 r.p.m. y lavados con agua para eliminar el exceso de 3,4-DHS y otros productos de reacción.

### **M.3.9 Determinación del tamaño de las nanopartículas de oro**

El tamaño y concentración de las nanopartículas sintetizadas se determinó a partir del método descrito por Haiss y colaboradores [Haiss, 2007]. Este método se basa en la medida de las absorbancias a una longitud de onda de 450nm y a la longitud de onda correspondiente a la banda de máxima absorción de las nanopartículas sintetizadas. A partir del cociente entre ambas y utilizando una serie de tablas propuestas por Haiss se pudo estimar su tamaño, su coeficiente de extinción molar y, de este modo, su concentración.

### **M.3.10 Modificación de electrodos con AuNPs-DHS**

Sobre la superficie del electrodo de trabajo de electrodos serigrafiados de carbono se depositaron 4  $\mu\text{L}$  (70 fmol) de las nanopartículas sintetizadas.

### M.3.11 Preparación del biosensor de lactato

Se depositaron 5  $\mu\text{L}$  (1U) de la enzima lactato oxidasa (LOx) sobre los electrodos serigrafiados de carbono previamente modificados con los nanomateriales. Se mantuvieron durante 1 hora a 4  $^{\circ}\text{C}$  para la inmovilización de la proteína sobre la superficie del electrodo.

### M.3.12 Determinación de lactato mediante el kit enzimático

La cantidad de lactato presente en las muestras se determinó espectrofotométricamente siguiendo las instrucciones del fabricante (Megazyme). A la muestra diluida en el tampón de medida se le añadieron  $\text{NAD}^{+}$  y la enzima D-glutamato-piruvato transaminasa (D-GTP). Tras 3 minutos de estabilización, se anotó la absorbancia a 340 nm ( $A_1$ ). Se le añadió lactato deshidrogenasa (L-LDH) y se anotó la absorbancia pasados 10 minutos ( $A_2$ ). La concentración de lactato se calculó según la ecuación:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot (A_2 - A_1)$$

donde  $V$  es el volumen final,  $MW$ , la masa molecular del ácido láctico ( $90.1 \text{ g mol}^{-1}$ ),  $\epsilon$ , el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ( $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $d$ , el paso óptico de la celda espectrofotométrica (1 cm) y  $v$ , el volumen de la muestra.

Además de la dilución, las muestras de cerveza fueron desgasificadas previamente y las muestras de yogur se sometieron a un pretratamiento para su clarificación. En un matraz aforado de 50 mL se depositaron 0.5 mL de yogur líquido. Se añadieron 1 mL de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.085 M (reactivo de Carrez I), 1 mL de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (reactivo de Carrez II) y 2 mL de NaOH 0.1 M. Se enrasó con agua y se filtró.

### M.3.13 Estimación de la concentración de CNDs

Teniendo en cuenta la masa de reactivos en la pesada inicial y el porcentaje de carbono presente, obtenido mediante análisis elemental, se estimó la cantidad total de carbono en la muestra. A partir de la relación de volúmenes del carbono y de los nanopuntos sintetizados (calculado a partir del diámetro de las partículas obtenido por

DLS) se obtuvo el número de átomos de carbono que forman cada nanopunto y el número de total de nanopuntos. Se estimó una concentración de CNDs de 277  $\mu\text{M}$ .

#### **M.3.14 Modificación de electrodos con CNDs**

Se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de una dispersión 3.5  $\mu\text{M}$  de CNDs sobre la superficie del electrodo de trabajo de electrodos serigrafiados de oro y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente durante 24 horas.

#### **M.3.15 Inmovilización de ADN sobre los electrodos nanoestructurados**

Sobre los electrodos nanoestructurados con CNDs se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 2.0 mM de ADN de cadena sencilla o doble. Tras la evaporación del disolvente se lavó con agua esterilizada durante 30 minutos para eliminar el ADN débilmente adsorbido.

#### **M.3.16 Preparación del biosensor de ADN**

Se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de disoluciones 40  $\mu\text{M}$  de las secuencias sintéticas de captura (HP1, WT) sobre los electrodos nanoestructurados con CNDs. El electrodo se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas y se lavó con agua esterilizada durante 30 minutos.

#### **M.3.17 Desnaturalización de las muestras de ADN de PCR**

Las muestras obtenidas mediante PCR se desnaturalizaron inmediatamente antes de su utilización por calentamiento en baño de agua a 100 °C durante 20 minutos seguido de un enfriamiento rápido en baño de hielo [Pang, 1995].

#### **M.3.18 Hibridación de ADN en el biosensor**

Sobre el biosensor preparado por nanoestructuración de AuSPE con CNDs y modificación con la sonda de ADN de captura se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de la secuencia analito de concentración 20  $\mu\text{M}$  para los oligonucleótidos sintéticos y 5.0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para las muestras de PCR desnaturalizadas.

### M.3.19 Detección del evento de hibridación en el biosensor de ADN

Tras la hibridación de la secuencia analito con la sonda en la superficie del electrodo, los electrodos modificados con ADN se sumergieron en una disolución de safranina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 y se aplicaron 100 barridos cíclicos de potencial a 100 mV s<sup>-1</sup>. Posteriormente, los electrodos se aclararon con agua esterilizada y se registraron los voltamperogramas de diferencial de impulsos (DPV) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

### M.3.20 Determinación de la temperatura de desnaturalización (T<sub>m</sub>)

Las curvas de para la determinación de la temperatura de desnaturalización se realizaron por representación de la absorbancia a 260 nm de disoluciones de ADN en concentración 60 µM frente a la temperatura en la cubeta. Las medidas se llevaron a cabo en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Para el control de la temperatura, el espectrofotómetro se conectó a un baño termostatzado y la variación de la temperatura se realizó entre 30 y 90 °C a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup>.

## M.4. Cálculo de parámetros y constantes de interés

### M.4.1 Determinación del área del electrodo electroquímicamente activa

El área electroquímica de los electrodos se estimó utilizando la ecuación:

$$Q = 2n \cdot F \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot t^{1/2} \cdot \pi^{1/2} \cdot A \quad (1)$$

donde Q es la carga pasada en función del tiempo, n es el número de electrones implicados en el proceso, F es la constante de Faraday, C es la concentración del mediador, D es el coeficiente de difusión, t es el tiempo transcurrido y A es el área electroquímica [Bard, 2001]. Q se estimó mediante cronocolumbimetría a +0.4 V en K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5 mM disuelto en tampón fosfato 0.1 M pH7.0 con KCl 1 M.

### M.4.2 Recubrimiento superficial del material depositado sobre la superficie del electrodo

El recubrimiento superficial del material depositado sobre las diferentes superficies electrónicas se ha estimado a partir de la integración del área de la onda anódica de los correspondientes voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados, a partir de la siguiente expresión:

$$\Gamma = \frac{Q}{n \cdot F \cdot A} \quad (2)$$

donde Q es la carga obtenida por integración del pico anódico, n el número de electrones implicados en el proceso, F la constante de Faraday ( $C \text{ mol}^{-1}$ ) y A el área electroactiva del electrodo de trabajo ( $\text{cm}^2$ ).

### M.4.3 Constante heterogénea de transferencia de carga. Especies inmovilizadas sobre la superficie del electrodo

Se ha calculado la constante heterogénea de transferencia de carga ( $k_s$ ) entre el mediador redox inmovilizado y la superficie electrónica mediante voltamperometría cíclica utilizando el método descrito por Laviron [Laviron, 1979]. Este establece que cuando la diferencia de potencial de pico anódico y catódico supera el valor correspondiente a  $200/n \text{ mV}$ , es posible calcular el coeficiente de transferencia de carga ( $\alpha$ ), así como la constante heterogénea de transferencia de carga ( $k_s$ ) para el sistema sometido a estudio, utilizando para ello las ecuaciones siguientes:

$$E_{pa} = E^{0'} + \frac{2.3RT}{\alpha nF} \cdot \log v \quad (3)$$

$$E_{pc} = E^{0'} - \frac{2.3RT}{(1-\alpha)nF} \cdot \log v \quad (4)$$

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nFv} - \frac{nF\Delta E_p \alpha(1-\alpha)}{2.3RT} \quad (5)$$

El coeficiente de transferencia de carga ( $\alpha$ ) se calcula gráficamente. Para ello, se representan los potenciales de pico anódico y catódico frente al logaritmo de la velocidad de barrido, obteniéndose dos curvas asintóticas respecto al potencial formal

del sistema. Cuando se supera el valor de  $200/n$ , propuesto por Laviron, se puede obtener el coeficiente  $\alpha$  mediante las ecuaciones (3) y (4) de la intersección de las pendientes de las rectas con el potencial formal. La constante heterogénea de transferencia de carga ( $k_s$ ) se calcula a partir de la ecuación (5).

#### M.4.4 Constante catalítica mediante el método de Galus

La constante catalítica de procesos electrocatalíticos con electrodos modificados se estimó mediante cronoamperometría de un solo pulso en función de la concentración de sustrato, según el método descrito por Galus [Galus, 1991]. Este procedimiento se basa en la ecuación:

$$I_{CAT}/I_D = \gamma^{1/2} [\pi^{1/2} \text{erf}(\gamma^{1/2}) + \exp(-\gamma)/\gamma^{1/2}] \quad (6)$$

donde la relación  $I_{CAT}/I_D$ , se define como la eficiencia catalítica del electrodo modificado, expresada como la respuesta del mismo en presencia ( $I_{CAT}$ ) y en ausencia ( $I_D$ ) de la sustancia electrocatalizada,  $\gamma$  es el argumento de la función de error, descrita como  $\gamma = kC^*t$ , donde  $C^*$  es la concentración de la sustancia electrocatalizada (mol/L) en el seno de la disolución y  $k$  es la constante catalítica. En el caso de que  $\gamma$  supere el valor de 2, la función de error es casi igual a 1 y la ecuación anterior se puede simplificar a:

$$I_{CAT}/I_D = \pi^{1/2} \gamma^{1/2} = (\pi k C^* t)^{1/2} \quad (7)$$

donde  $t$  es el tiempo transcurrido en segundos. La representación de  $I_{CAT}/I_D$  respecto a la raíz cuadrada del tiempo de muestreo ( $t^{1/2}$ ) para las distintas concentraciones de la especie electroactiva da lugar a diferentes rectas. De la representación de las pendientes de estas rectas frente a  $C^{1/2}$  se obtiene otra recta, cuya pendiente permite estimar la constante catalítica ( $k$ ), expresada en  $M^{-1} s^{-1}$ , de acuerdo con la ecuación (7).

#### M.4.5 Coeficiente de difusión

El coeficiente de difusión para especies en disolución se ha estimado mediante cronoamperometría de un solo pulso en función de la concentración de la especie, utilizando para ello la ecuación de Cottrell para un electrodo plano:

$$I = nFAC_0\sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (8)$$

donde  $I$  es la corriente límite de difusión (A),  $n$  es el número de electrones transferidos,  $F$  es la constante de Faraday,  $A$  es el área de trabajo ( $\text{cm}^2$ ),  $C_0$  es la concentración ( $\text{mol cm}^{-3}$ ),  $t$  es el tiempo de muestreo (s) y  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ).

La representación de la corriente límite de difusión frente al inverso de la raíz cuadrada del tiempo de muestreo ( $t^{-1/2}$ ) para las distintas concentraciones de la especie estudiada es una línea recta. De la representación de las pendientes de esta recta frente a  $C_0$  se obtiene una recta, cuya pendiente permite estimar el coeficiente de difusión ( $D$ ), de acuerdo con la ecuación (8).

#### M.4.6 Deconvolución de bandas

Para la deconvolución de las bandas de los espectros Raman se utilizó el programa Microsoft Excel con el complemento Solver. Todas las bandas se ajustaron a una función Lorentziana, excepto en la banda G, para la que se usó una función Breit-Wigner-Fano (BWF) [Ferrari, 2000]. La expresión de la función Lorentziana se muestra en la ecuación (9).

$$L(x) = \frac{1}{\pi} \frac{\sigma}{(x-\mu)^2 + (\sigma)^2} \quad (9)$$

donde  $\mu$  es el centro de la curva y  $\sigma$  es la anchura de la banda.

La función BWF se expresa como:

$$BWF(x) = \frac{A\left(\frac{q\sigma}{2} + x - \mu\right)^2}{\left(\frac{\sigma}{2}\right)^2 + (x - \mu)^2} \quad (10)$$

donde  $\mu$  es el centro de la curva,  $\sigma$  es la anchura de la banda y  $q$  es el parámetro de Fano.

## Resultados y discusión

---





## Capítulo 1

---



# 1. Plataformas electrocatalíticas basadas en nanotubos de carbono y en la química de las sales de diazonio

---

El objetivo perseguido en este capítulo es la construcción de plataformas electrocatalíticas mediante la nanoestructuración de electrodos para su aplicación en el desarrollo de sensores. El nanomaterial utilizado en este caso son los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs). Con el propósito de conseguir plataformas nanoestructuradas estables, se han estudiado diferentes estrategias de inmovilización de los MWCNTs basadas en las sales de diazonio. Las sales de diazonio son compuestos que presentan en su estructura el grupo diazonio ( $\text{N}\equiv\text{N}^+\text{-R}$ ). Su formación se basa en la reacción de una amina aromática con nitrito sódico en medio ácido, en el proceso conocido como diazotación, tal como se describe en la introducción de esta memoria. Las sales de arildiazonio en disolución son relativamente estables en medio ácido, baja temperatura y protegidas de la luz. Debido a su alta reactividad y al gran rendimiento que se obtiene en los procesos que participan se utilizan como intermedios de reacción en la síntesis de fenoles, haluros y nitrilos, entre otros. La reducción electroquímica de las sales de diazonio genera un radical arilo que se une covalentemente a la superficie del electrodo en el proceso de electroinjerto. La utilización de nanotubos de carbono derivatizados con grupos amina ( $\text{MWCNTs-NH}_2$ ) permite la unión covalente de estos al electrodo. De esta manera, las plataformas desarrolladas serán más estables.

En concreto, en este capítulo se han desarrollado plataformas electrocatalíticas frente a la oxidación de NADH e hidrazina mediante la nanoestructuración de electrodos serigráficos (SPE) con MWCNTs. Se estudiaron diferentes estrategias para la inmovilización de los MWCNTs sobre los electrodos. Las plataformas nanoestructuradas se modificaron posteriormente con 3,4-DHS para mejorar sus propiedades electrocatalíticas.

## 1.1 Inmovilización de los MWCNTs sobre los electrodos

La nanoestructuración de los electrodos serigrafados con MWCNTs aaminados y no aaminados se llevó a cabo mediante distintas estrategias, tres de ellas basadas en la química de las sales de diazonio, otra, en la reacción de condensación de aminas y ácidos carboxílicos y una quinta, de forma más sencilla, por adsorción directa, que sirve a modo de comparación.

La dispersión de los nanotubos de carbono de pared múltiple previa a su utilización, se realizó mediante la combinación de dos métodos, la utilización de un surfactante aniónico, el SDS, y un baño de ultrasonidos.

### 1.1.1 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 1

La estrategia 1 consistió en la diazotación y electroinjerto de nanotubos de carbono aaminados sobre los electrodos serigrafados. La diazotación de los grupos amina presentes en los MWCNTs se llevó a cabo según se muestra en la figura 1.1, como se describe en la sección de materiales y métodos. Una vez formada la sal de diazonio, se llevó a cabo el electroinjerto de los nanotubos diazotados sobre los electrodos serigrafados de oro (AuSPEs) o carbono (CSPEs) aplicando barridos cíclicos de potencial entre +0.6V y -0.6V a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

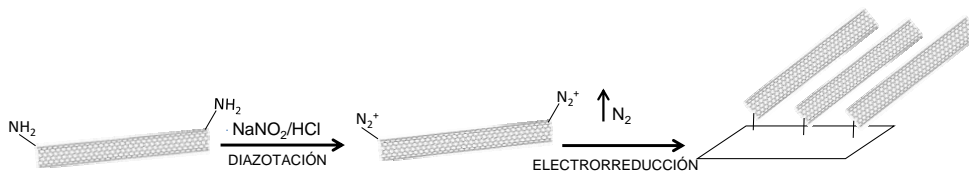


Fig. 1.1. Esquema de la estrategia 1 de nanoestructuración de electrodos.

En la figura 1.2 se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes al proceso de electroinjerto de los MWCNTs- $\text{NH}_2$  sobre los electrodos serigrafados de carbono. En el primer barrido de electroinjerto de los MWCNTs- $\text{NH}_2$  diazotados (fig. 1.2A) se observa un solo pico a -0.21 V en el barrido catódico, que se adscribe a la reducción del grupo diazonio, como se confirma por la ausencia de pico en la figura 1.2B, donde los MWCNTs- $\text{NH}_2$  no han sido previamente diazotados.

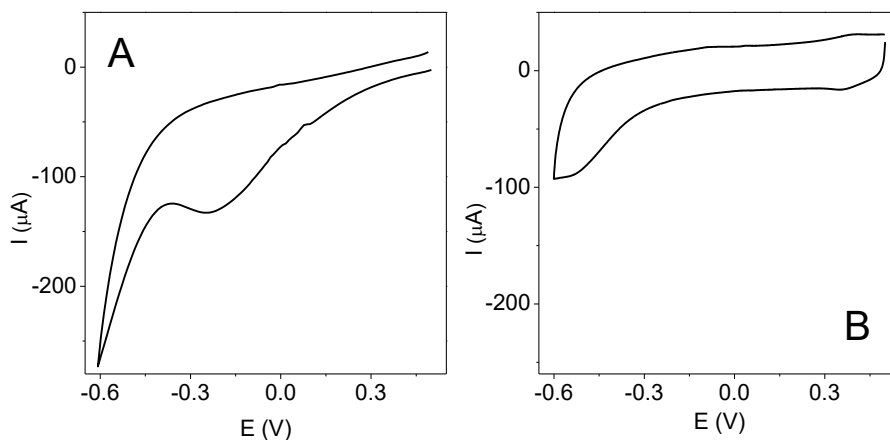


Fig. 1.2. Voltamperogramas cíclicos del proceso de electroinjerto sobre CSPEs de MWCNTs-NH<sub>2</sub> diazotados (A) y sin diazotar (B) en medio HCl 0.1 M. Velocidad de barrido 100 mV s<sup>-1</sup>.

Durante el proceso de electroinjerto se forma un radical arilo, que forma un enlace covalente con la superficie. Este radical puede reaccionar con otros nanotubos ya injertados, formando multicapas de CNTs sobre la superficie del electrodo [Kariuki, 2001; Laforgue, 2005]. Con objeto de establecer si la cantidad de MWCNTs injertados en la superficie es dependiente del número de barridos de potencial aplicados se estudió la influencia de este factor en las propiedades electroquímicas de los electrodos nanoestructurados preparados. Para ello se utilizó una sonda electroquímica, el  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$  5.0 mM en tampón fosfato (PB) 0.1 M pH 7.0 y se estudió la respuesta ciclovoltamperométrica de los distintos electrodos preparados.

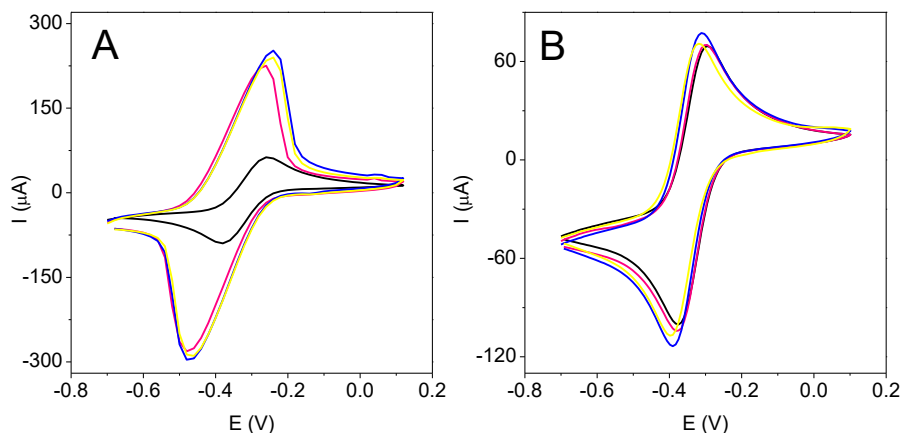


Fig. 1.3. Voltamperogramas cíclicos en  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$  5.0 mM en tampón fosfato (PB) 0.1 M pH 7.0 antes (—) y tras la nanoestructuración con MWCNTs aplicando 10 (—), 40 (—) y 60 (—) barridos en el proceso de electroinjerto en la estrategia 1 para CSPEs (A) y AuSPEs (B)  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

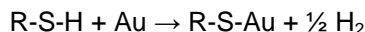
En la figura 1.3 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos con electrodos serigrafados de carbono u oro nanoestructurados mediante la estrategia 1 aplicando 10, 40 y 60 barridos cíclicos de potencial, así como del electrodo no nanoestructurado, en presencia de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ . En el caso de los electrodos serigrafados de carbono (figura 1.3A) se observa un aumento considerable de la señal del electrodo nanoestructurado con respecto al electrodo sin nanoestructurar, probablemente debido a un aumento en el área electroactiva y de la transferencia de carga en presencia de los nanotubos inmovilizados. La respuesta aumenta con el número de barridos hasta 40. Al seguir aumentando la cantidad de nanomaterial sobre la superficie del electrodo se aprecia una disminución en la respuesta electroquímica, probablemente debido a la formación de multicapas de MWCNTs, que dificultan la difusión de la sonda a la superficie del electrodo. Por este motivo se eligió 40 como el número óptimo de barridos para llevar a cabo el proceso de electroinjerto.

En el caso de los electrodos serigrafados de oro (figura 1.3B) se observa la misma tendencia que en carbono, obteniéndose la mayor intensidad para 40 barridos de electroinjerto. Sin embargo, en este caso, la presencia de nanotubos produce una mejora más modesta de la respuesta electroquímica de la sonda al compararla con la

del electrodo sin nanoestructurar. Este hecho sugiere que el proceso de electroinjerto de los MWCNTs diazotados es menos eficiente sobre electrodos de oro que sobre los de carbono.

### 1.1.2 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 2

La estrategia 2 de inmovilización de los nanotubos de carbono sobre los electrodos serigrafiados está también basada en la química de las sales de diazonio. En este caso, se utilizaron MWCNTs no modificados. Sobre ellos se electroinjetaron las sales de diazonio generadas sobre la superficie del electrodo, según el esquema de la figura 1.4. Para ello, se modificó la superficie del electrodo de oro con 4-aminotiofenol (4-ATP). Los tioles tienen una gran afinidad por el oro [Dubois, 1992] y se unen a él formando una monocapa autoensamblada (SAM) [Ulman, 1996]. La quimisorción de tioles sobre el oro es una adición oxidativa del enlace S-H a la superficie del oro, seguida de una eliminación por reducción de hidrógeno, según la reacción:



La formación de la SAM de 4-ATP sobre la superficie del electrodo deja esta recubierta con grupos amino expuestos hacia la disolución, sobre los que se pueden generar sales de diazonio. La reacción de diazotación se llevó a cabo como se describe en la sección de materiales y métodos. El proceso de electroinjerto se realizó cubriendo el electrodo con una disolución de MWCNTs en ácido clorhídrico 0.1 M y mediante la aplicación de barridos cíclicos de potencial entre +0.6V y -0.6V a 100 mV s<sup>-1</sup> para injertar los MWCNTs a la superficie.

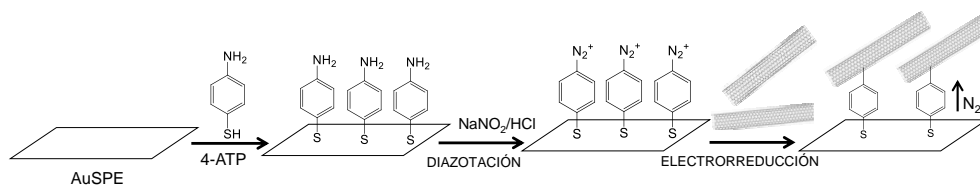


Fig. 1.4. Esquema de la estrategia 2 de nanoestructuración de electrodos

Como se ha comentado anteriormente, la cantidad de MWCNTs electroinjetados sobre la superficie del electrodo depende del número de barridos de electroinjerto, por



lo que se estudió la influencia de este parámetro en la respuesta electroquímica de los electrodos nanoestructurados, utilizando voltamperometría cíclica en presencia de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$  en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

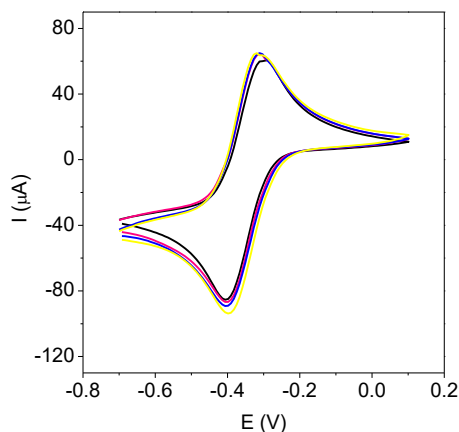


Fig. 1.5. Voltamperogramas cíclicos en  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$  en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 antes (—) y tras la nanoestructuración con MWCNTs aplicando 10 (—), 40 (—) y 60 (—) barridos en el proceso de electroinjerto en la estrategia 2 para AuSPEs a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 1.5 se muestran los voltamperogramas cíclicos de electrodos serigrafiados de oro nanoestructurados mediante la estrategia 2 aplicando 10, 40 y 60 barridos cíclicos de potencial, así como del electrodo no nanoestructurado, en presencia de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ . Cuando los AuSPEs se modifican empleando la estrategia 2, el aumento de la señal electroquímica con el número de barridos es más pequeño que cuando se emplea la estrategia 1. Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta el fundamento de las diferentes estrategias empleadas, ya que en la estrategia 1 los MWCNTs- $\text{NH}_2$  se diazotan y se unen covalentemente a la superficie de los electrodos, mientras que en la estrategia 2, se unen covalentemente MWCNTs no modificados a los grupos amino diazotados presentes en el 4-ATP que modifica la superficie de AuSPE. Obviamente, el número y la accesibilidad de los grupos amino disponibles para unir los MWCNTs a la superficie del electrodo son diferentes en ambas estrategias, por lo que el tiempo requerido para el proceso de electroinjerto es diferente. En este caso, la mayor señal se obtiene para 60 barridos, por lo que se eligió 60 como el número óptimo de barridos de electroinjerto en la estrategia 2.

### 1.1.3 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 3

La estrategia 3 también se basa en la química de las sales de diazonio y en la modificación previa de la superficie del electrodo con una monocapa autoensamblada de 4-ATP como en la estrategia 2, en este caso, en la formación de un enlace triazeno. [Norman, 1993]. El enlace triazeno, también llamado diazoaminobenceno, se forma por el ataque nucleofílico del nitrógeno de la amina al nitrógeno terminal del catión diazo, como se muestra en el esquema de la figura 1.6.

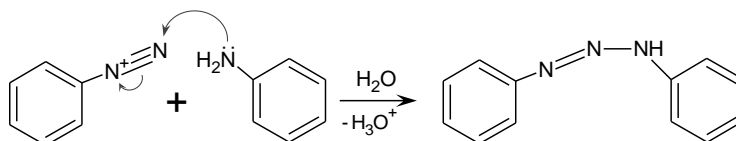


Fig. 1.6. Esquema de formación del enlace triazeno.

Tras la modificación con 4-ATP, los grupos amino presentes en la superficie se diazotaron de la misma manera que en la estrategia 2 y los MWCNTs-NH<sub>2</sub> se unieron a la superficie mediante la formación de un enlace triazeno en medio básico, según se muestra en el esquema de la figura 1.7.

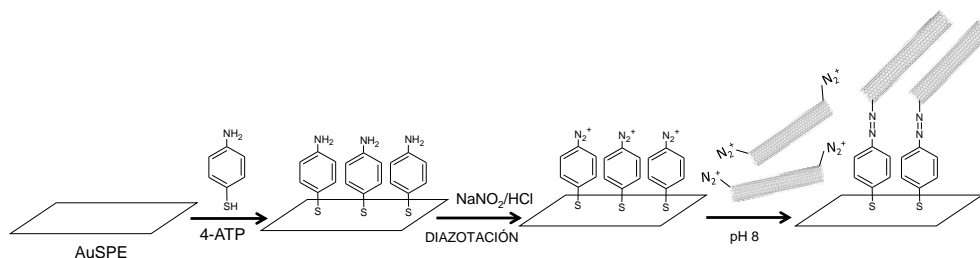


Fig. 1.7 Esquema de la estrategia 3 de nanoestructuración de electrodos.

### 1.1.4 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 4

Para la nanoestructuración según la estrategia 4 se utilizaron nanotubos modificados con grupos carboxílicos (MWCNTs-COOH) y, al igual que en la anterior, electrodos modificados previamente con una monocapa de 4-ATP. En este caso se trata de formar un enlace amida entre las aminas del 4-ATP y los grupos carboxílicos de los MWCNTs-COOH, mediante reacción entre carbodiimida (EDC, 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida) e hidroxisuccinimida (NHS, N-hidroxisuccinimida), como se muestra en el esquema de la figura 1.8.

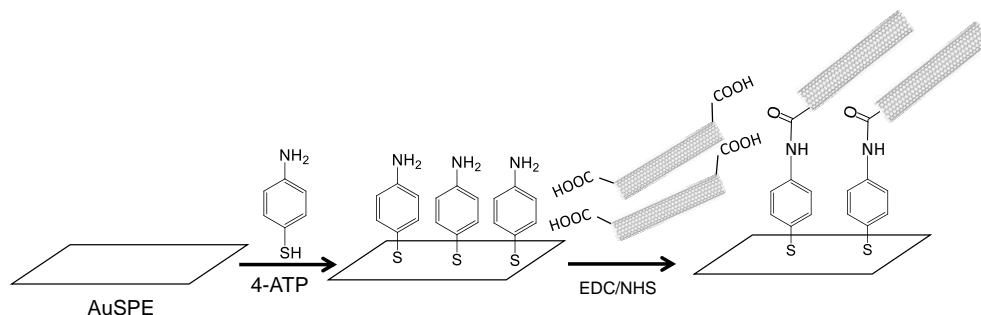


Fig. 1.8 Esquema de la estrategia 4 de nanoestructuración de electrodos.

### 1.1.5 Nanoestructuración de los electrodos según la estrategia 5

A modo de comparación y para comprobar la eficiencia de la nanoestructuración covalente, se estudió la estrategia 5, que consiste en la adsorción directa de los MWCNTs- $\text{NH}_2$  sobre la superficie de los electrodos serigraviados, tanto de oro como de carbono, tal como se muestra en el esquema de la figura 1.9.

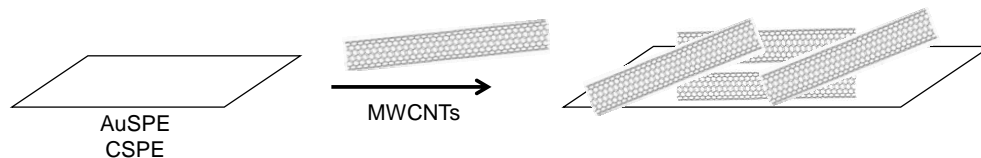


Fig. 1.9 Esquema de la estrategia 5 de nanoestructuración de electrodos.

## 1.2 Caracterización de los electrodos nanoestructurados con nanotubos de carbono

Con el objetivo de constatar la presencia y estudiar la distribución de los MWCNTs sobre los electrodos nanoestructurados mediante las diferentes estrategias, estos se caracterizaron mediante técnicas de caracterización de superficies como la microscopía electrónica de barrido (SEM) o la microscopía de fuerzas atómicas (AFM), así como mediante voltamperometría cíclica en presencia de una sonda electroquímica.

### **1.2.1 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica que permite estudiar la morfología y composición de una superficie. Se basa en el análisis de los electrones retrodispersados o secundarios emitidos al incidir sobre la muestra un haz de electrones. Los electrodos nanoestructurados se caracterizaron mediante SEM, siendo así posible distinguir la distribución de los MWCNTs sobre la superficie de aquellos.

En la figura 1.10 se muestran las imágenes obtenidas para AuSPEs nanoestructurados siguiendo las diferentes estrategias propuestas. Los electrodos serigrafiados (A) presentan una estructura granular en la que los granos de oro se encuentran unidos entre sí por un polímero conductor. Tras la nanoestructuración, se pueden apreciar los MWCNTs cubriendo los electrodos. Cuando se utilizan las estrategias basadas en diazotación y electroinjerto de las sales de diazonio (B y C), se observa una menor cantidad de nanotubos sobre la superficie al comparar con la adsorción directa (F). En el caso de las modificaciones basadas en la formación de las sales de diazonio (estrategias 1 y 2) se puede apreciar una cobertura similar a un velo cubriendo las estructuras granulares de la superficie del electrodo, sin embargo aún es posible distinguir la estructura rugosa inferior. La adsorción directa de los MWCNTs (estrategia 5) sobre la superficie del electrodo (F) da lugar a una cobertura mucho mayor. En este caso, la imagen es similar a las anteriores, sin embargo, las estructuras granulares ya no son tan nítidas como en el caso de las estrategias basadas en las sales de diazonio. De hecho, la imagen está ligeramente borrosa, pero las diferencias de densidad son claras. Cuando los AuSPEs se modifican mediante las estrategias 3 y 4 (D y E) no se pueden apreciar los nanotubos en la superficie, es decir, la estrategia de inmovilización no resulta muy efectiva.

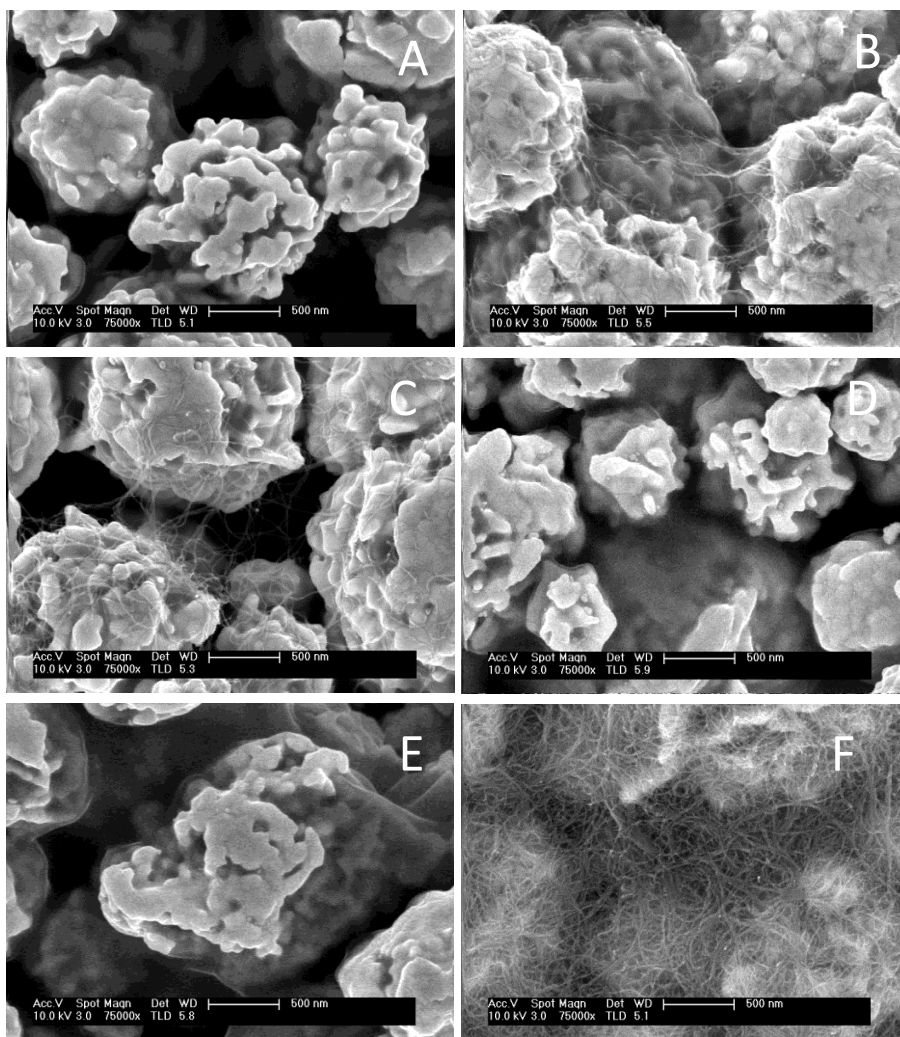


Fig. 1.10 Imágenes de SEM de los AuSPEs no nanoestructurados (A) y nanoestructurados según las diferentes estrategias: (B) estrategia 1, (C) estrategia 2, (D) estrategia 3, (E) estrategia 4 y (F) estrategia 5.

En el caso de los CSPEs (figura 1.11) no parece haber diferencias sustanciales con respecto a los AuSPEs, se observa la misma tendencia. Los electrodos no nanoestructurados (A) presentan también una estructura granular, aunque en este caso el tamaño de grano es menor. La nanoestructuración con los MWCNTs mediante diazotación y electroinjerto, estrategia 1 (B), da lugar a un recubrimiento

superficial inferior a la adsorción directa (estrategia 5) (C), lo que sugiere que estos electrodos muestran una mayor área electroactiva para una misma área geométrica. En este caso, se pueden observar incluso ovillos de MWCNTs, lo que hace que los electrodos nanoestructurados mediante adsorción directa sean menos reproducibles.

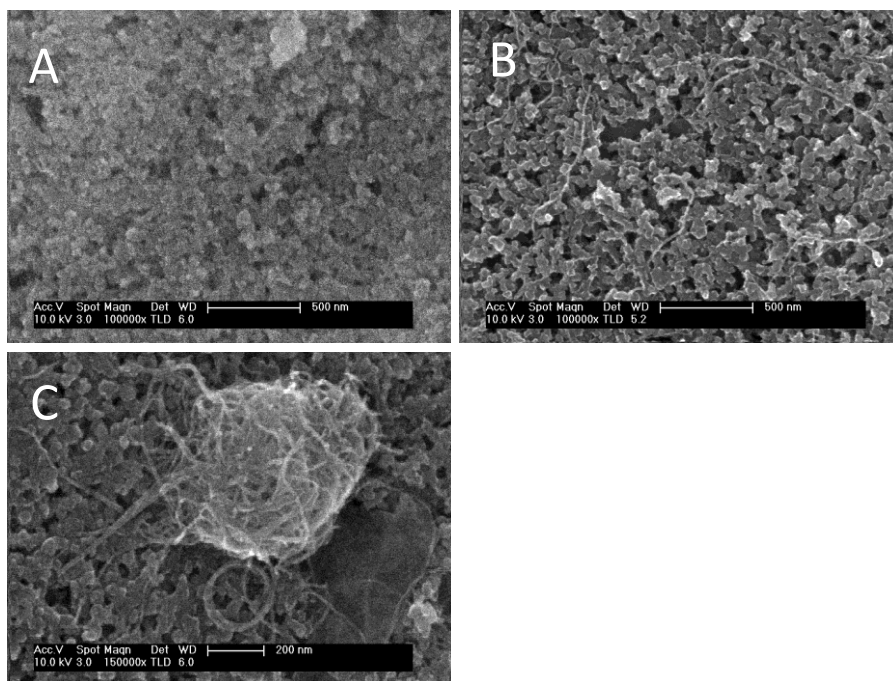


Fig. 1.11 Imágenes de SEM de los CSPEs no nanoestructurados (A) y nanoestructurados mediante las estrategias: 1 (B) y 5 (C).

### 1.2.2 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

La microscopía de fuerzas atómicas (AFM) es una técnica que permite registrar la imagen topográfica de una superficie mediante la interacción de esta con una sonda piramidal llamada *cantilever*, que va acoplada a una palanca flexible.

Con el fin de conocer la disposición de los MWCNTs sobre los electrodos, se estudió su superficie utilizando AFM. Debido a la naturaleza granular de los electrodos serigrafiados, en lugar de estos se utilizaron placas de vidrio recubiertas con una capa fina de oro, previamente calentadas para conseguir terrazas de oro (111).

Como se comentó anteriormente, la funcionalización de los nanomateriales de carbono tiene lugar preferentemente en las zonas que presentan defectos, lo que en el caso de los nanotubos son los extremos abiertos. Por este motivo, se espera que los grupos amino presentes en los MWCNTS-NH<sub>2</sub> que se utilizan en la estrategia 1, se encuentren principalmente en los extremos. Si esto es así, tras la diazotación y electroinjerto, los MWCNTs deberían encontrarse formando un ángulo sobre la superficie. Existen ejemplos en la bibliografía de nanotubos dispuestos de forma perpendicular a la superficie [Diao, 2002; Gooding, 2003; Liu, 2000; Diao, 2010]. En estos ejemplos los CNTs tienen un tamaño inferior a 200 nm.

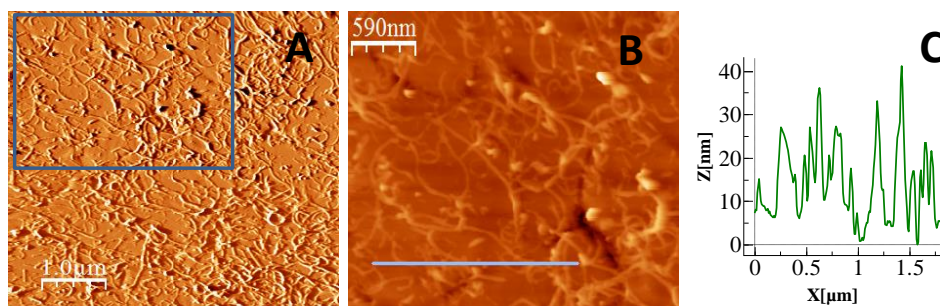


Fig. 1.12 Imágenes de AFM (A, B) y perfil (C) de una lámina de oro modificada con MWCNTs mediante la estrategia 1.

En la figura 1.12 se muestran las imágenes (A, B) y perfil (C) de los MWCNTs depositados sobre la superficie de oro mediante la estrategia 1. En las imágenes (A, B) se puede observar que los MWCNTs inmovilizados se encuentran tumbados y homogéneamente distribuidos. Sin embargo, el perfil (C) que corresponde a la figura 1.12B muestra alturas en torno a 20 nm. Este valor es superior al diámetro proporcionado por la casa comercial de 9.5 nm, por lo que, aunque los MWCNTs utilizados son demasiado largos para obtener una perpendicularidad perfecta (alrededor de 1 μM), la inmovilización mediante la estrategia 1 puede dar lugar a algún tipo de verticalidad en la parte cercana a la superficie del electrodo, como se muestra en la figura 1.13.

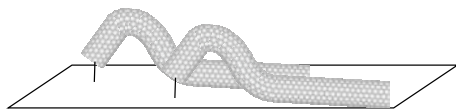


Fig. 1.13 Esquema de la alineación de los MWCNTs sobre la superficie modificada según la estrategia 1.

En la figura 1.14 se muestran las imágenes (A, B) y los perfiles (C-E) de las superficies modificadas mediante la estrategia 5. En este caso, resultaron más difíciles de obtener debido a la presencia de gran cantidad de material, por lo que fue necesario tomar la imagen en el borde de la superficie para poder distinguir las características de los agregados de tamaño nanométrico. En las imágenes (A, B) se pueden ver los MWCNTs formando un lecho sobre la superficie. Los perfiles (C-E) muestran un perfil de alturas poco homogéneo, con zonas más y menos pobladas. Estos resultados confirman la heterogeneidad de la distribución de los MWCNTs inmovilizados mediante la estrategia 5.

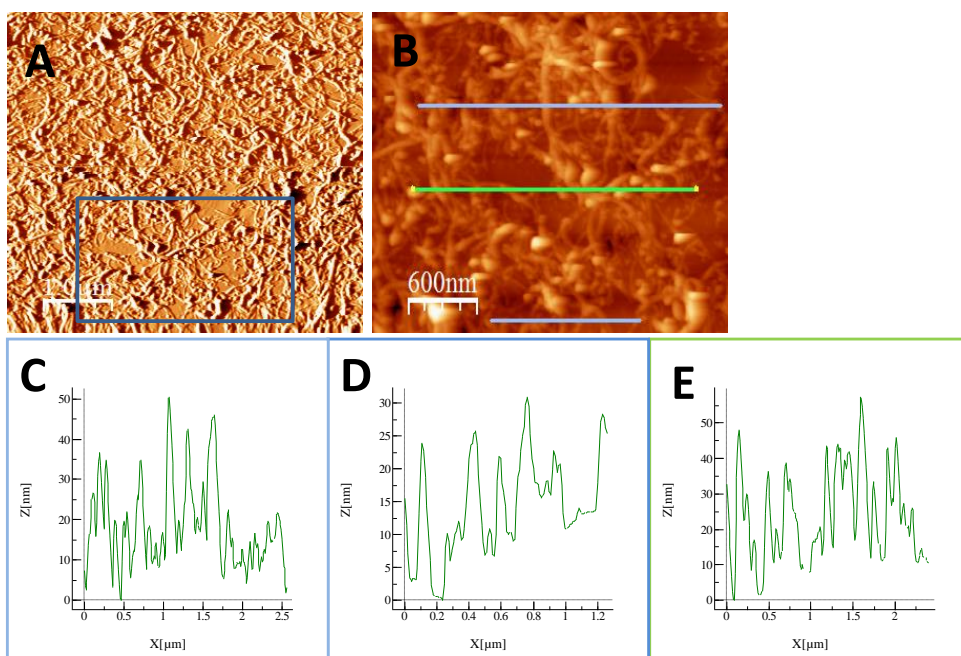


Fig. 1.14 Imágenes de AFM (A, B) y perfiles (C, D, E) de una lámina de oro modificada con MWCNTs mediante la estrategia 5.



### 1.2.3 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante voltamperometría cíclica

En los nanotubos de carbono, existen dos regiones superficiales con distintas propiedades, las paredes y los extremos. Dependiendo de la orientación de estos sobre el electrodo, la electroquímica estará dominada por una de las dos regiones. La velocidad de transferencia de carga para los CNTs depende de la superficie. Los extremos de los CNTs se asemejan a los bordes del grafito pirolítico con excelentes propiedades de transferencia electrónica, mientras que las paredes se comparan con los planos basales del grafito, con una cinética de transferencia electrónica mucho más lenta [Li, 2002]. Nugent describió [Nugent, 2001] el comportamiento electroquímico de la sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  en grafito pirolítico. La separación de picos del voltamperograma ( $\Delta E_p$ ) en los planos basales presenta una separación diez veces mayor que en los bordes, indicando que la transferencia electrónica es mucho más rápida en los bordes. Gooding y colaboradores [Gooding, 2005] describieron un comportamiento similar en el caso de los nanotubos de carbono. En este caso, cuando los nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNTs) se encuentran dispuestos de forma perpendicular a la superficie se observa menor  $\Delta E_p$  que cuando los nanotubos se adsorben directamente sobre la superficie del electrodo formando un lecho. La presencia de defectos en la superficie de los nanotubos aumenta considerablemente la velocidad de transferencia electrónica [Pumera, 2008], sin embargo, se ha demostrado que la presencia de grupos oxigenados hace que disminuya [Banks, 2006].

Para investigar el comportamiento de las plataformas obtenidas por nanoestructuración con nanotubos mediante las diferentes estrategias, se estudió el comportamiento del par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  en dichas plataformas.

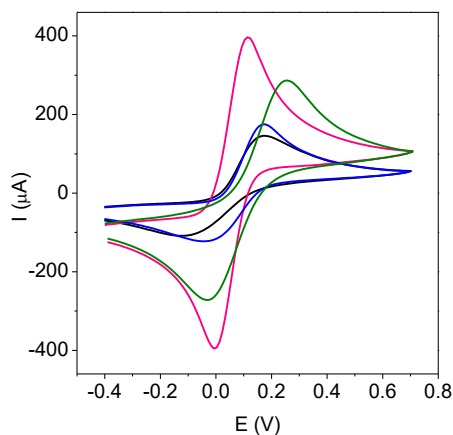


Fig. 1.15. Voltamperogramas cíclicos de AuSPEs antes (—) y tras la nanoestructuración según la estrategia 1 (—), estrategia 2 (—) y estrategia 5 (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  5 mM a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 1.15 se muestran los voltamperogramas cíclicos de AuSPEs nanoestructurados mediante las estrategias 1, 2 y 5. En todos los casos, el voltamperograma presenta un pico catódico y uno anódico bien definidos debidos al par de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ , lo que sugiere unas buenas propiedades electroconductoras para las diferentes superficies, que permiten la difusión rápida de la sonda electroquímica hacia el electrodo. Se puede apreciar un aumento considerable en la corriente anódica cuando el electrodo se modifica mediante las estrategias 1 ( $\Delta I_{\text{anódico}} = 0.22 \pm 0.05 \text{ mA}$ ) y 5 ( $\Delta I_{\text{anódico}} = 0.13 \pm 0.02 \text{ mA}$ ) frente al electrodo sin nanoestructurar, debido al aumento del área electroquímica por la presencia de MWCNTs. Como se comprobó en las imágenes de SEM, la nanoestructuración mediante la estrategia 2 produce un recubrimiento menor, por lo que el aumento en la corriente anódica para el  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  es más modesto ( $\Delta I_{\text{anódico}} = 0.03 \pm 0.01 \text{ mA}$ ) en este caso.

El comportamiento electroquímico de las plataformas obtenidas mediante las tres estrategias se estimó a partir de la separación entre el pico anódico y el catódico. Esta separación entre picos queda recogida en la tabla 1.1, siendo, en todos los casos, los valores presentados la media de tres réplicas.

Tabla 1.1. Separación de picos anódico y catódico de  $K_3[Fe(CN)_6]$  para AuSPEs sin nanoestructurar o nanoestructurados con MWCNTs según las diferentes estrategias.

Estrategia	$\Delta E_p$ (mV)
sin MWCNTs	$0.27 \pm 0.03$
1	$0.12 \pm 0.01$
2	$0.22 \pm 0.01$
5	$0.29 \pm 0.03$

La nanoestructuración mediante la estrategia 2 produce una pequeña disminución en la  $\Delta E_p$  y la estrategia 5 no produce variaciones sustanciales al comparar con el electrodo no nanoestructurado ( $\Delta E_p = 0.27 \pm 0.03$  V). Sin embargo, la nanoestructuración mediante la estrategia 1 produce una separación considerablemente menor ( $\Delta E_p = 0.12 \pm 0.01$  V). Teniendo en cuenta el trabajo de Gooding [Gooding, 2005] esta disminución significa que, aunque los nanotubos empleados son demasiado largos para obtener una verticalidad perfecta, la estrategia 1 da lugar a una distribución ligeramente perpendicular a la superficie del electrodo, como ya se observó en las imágenes y perfiles de AFM, en comparación con la estrategia 5, que conduce a una cama de MWCNTs. La estrategia 2 produce una ligera perpendicularidad.

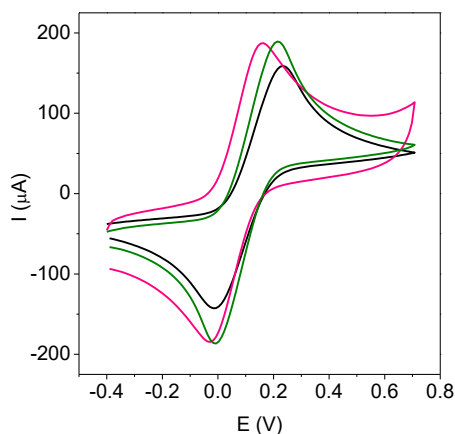


Fig. 1.16. Voltamperogramas cíclicos de CSPEs antes (—) y tras la nanoestructuración según la estrategia 1 (—) y estrategia 5 (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de  $K_3[Fe(CN)_6]$  5 mM a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 1.16 se muestran los voltamperogramas cíclicos de CSPEs nanoestructurados mediante las estrategias 1 y 5. En este caso, se observa también la respuesta típica del par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ . La separación de picos ( $\Delta E_p$ ) para los CSPEs se recoge en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Separación de picos anódico y catódico de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  para CSPEs sin nanoestructurar o nanoestructurados con MWCNTs según las diferentes estrategias.

Estrategia	$\Delta E_p$ (mV)
sin MWCNTs	$0.25 \pm 0.01$
1	$0.19 \pm 0.01$
5	$0.23 \pm 0.03$

Los CSPEs presentan un comportamiento voltamperométrico similar a los AuSPEs. La  $\Delta E_p$  para el electrodo no nanoestructurado es en este caso  $0.25 \pm 0.01$ , muy próxima a la que presenta el AuSPE no nanoestructurado. De nuevo, la nanoestructuración mediante la estrategia 5 supone una variación muy pequeña en la separación de picos y la nanoestructuración mediante la estrategia 1 provoca un comportamiento más reversible de la sonda ( $\Delta E_p = 0.19 \pm 0.01$ ). De esta manera se confirma que la estrategia 1 produce plataformas con un mejor comportamiento electroquímico.

### 1.3 Modificación con 3,4-DHS de las plataformas basadas en MWCNTs

El objetivo principal de la nanoestructuración de los electrodos con MWCNTs es su aplicación en el desarrollo de plataformas electrocatalíticas frente a la oxidación de moléculas de interés. Existen ejemplos en la bibliografía del uso de nanotubos de carbono con este fin en la detección de diferentes moléculas, tales como el uso de matrices de nanotubos de carbono ordenados verticalmente mediante fotolitografía para la detección de glutamato [Gholizadeh, 2012] o la detección de NADH mediante la nanoestructuración de electrodos con SWCNTs o MWCNTs [Musameh, 2002] o con CNTs dispersos en ácido hialurónico [Filip, 2011] o el uso de MWCNT-COOH disuelto en una mezcla de DMF y agua en la modificación de electrodos para la detección de *p*-acetaminofen, dopamina o peróxido de hidrógeno [Fanjul-Bolado, 2007].

Además de la mejora que implica el uso de nanotubos de carbono en el desarrollo de plataformas electrocatalíticas, se han descrito también otros ejemplos donde el uso de los nanotubos va acompañado de un mediador redox que mejora el proceso catalítico y lo hace más específico. Algunos de estos ejemplos son el uso de azul de Meldola y glutamato deshidrogenasa en la detección de glutamato [Chakraborty, 2007] o la detección de NADH mediante compósitos de tionina, CNTs y nafion [Huang, 2007], películas de CNTs, nafion y un mediador redox electroquímicamente generado a partir de serotonina, la 5,5'-dihidroxi-4,4'-bitriptamina [Raj, 2006], CNTs y alizarina [Puchakayala, 2012] o compósitos híbridos de CNTs funcionalizados con ácido xanturénico y flavín adenín dinucleótido (FAD) para la detección de NADH y  $H_2O_2$  [Lin, 2013].

Como ya se ha comentado, el 3,4-DHS presenta en su estructura grupos o-quinona, que han sido descritos como potentes electrocatalizadores, especialmente cuando se encuentran depositados o polimerizados sobre electrodos sólidos. Por ejemplo, películas de 3,4-dihidroxibenzaldehído electrodepositadas sobre electrodos de carbón vítreo presentan actividad electrocatalítica hacia la electrooxidación de NADH [Pariente, 1994; Pariente, 1996]. También se han empleado derivados de o-quinona en la reducción del alto sobrepotencial observado en la electrooxidación de hidrazina [Wang, 1996a; Golabi, 1999b; Golabi, 1999a; Golabi, 2001], entre ellos, el propio 3,4-DHS [Revenga-Parra, 2005].

El 3,4-DHS presenta dos grupos quinona/hidroquinona en su estructura. El proceso redox global de la molécula involucra cuatro electrones y cuatro protones, tal como se muestra en la figura 1.17. En su conjunto la molécula muestra un gran número de dobles enlaces conjugados, lo que sugiere una gran cantidad de carga deslocalizada a lo largo de la estructura molecular, circunstancia ideal para actuar como mediador de proceso de intercambio de electrones.

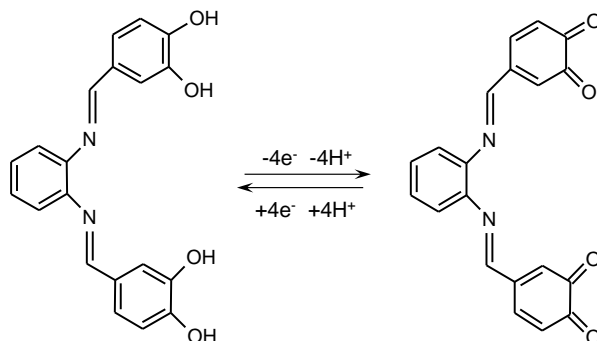


Fig. 1.17. Esquema del proceso de oxidación/reducción de los grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHS

El 3,4-DHS presenta, además, anillos aromáticos en su estructura, que le confieren cierta planaridad y sugiere la posibilidad de que se puedan adsorber sobre los nanotubos mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los anillos de las capas superiores. Teniendo en cuenta estas propiedades, se ha estudiado la modificación de las plataformas modificadas con MWCNTs desarrolladas y caracterizadas anteriormente, con 3,4-DHS con el objetivo de construir plataformas electrocatalíticas frente a la oxidación de NADH e hidrazina. La idea es que los electrones presentes en las formas reducidas de estos analitos puedan ser cedidos a la forma oxidada del mediador y que estos fluyan a través de los MWCNTs hacia la superficie electródica, dando lugar a una corriente electrocatalítica más alta que en ausencia de estos modificadores.

### 1.3.1 Modificación de AuSPEs con 3,4-DHS

La modificación de las plataformas desarrolladas con 3,4-DHS se llevó a cabo mediante adsorción directa del compuesto sobre AuSPEs nanoestructurados con MWCNTs. El mediador redox se disolvió en metanol, donde presenta una mayor solubilidad que en medio acuoso. Esto permite aumentar la concentración, además de facilitar el proceso de evaporación del disolvente.

La respuesta electroquímica de los electrodos nanoestructurados resultantes se estudió mediante voltamperometría cíclica en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0). El

potencial se barrió entre  $-0.2$  V y  $+0.4$  V a una velocidad de  $100$  mV s<sup>-1</sup>. En la figura 1.18 se puede observar el comportamiento voltamperométrico tras la modificación con 3,4-DHS de las plataformas desarrolladas basadas en electrodos serigrافيados de oro sin nanoestructurar (—) y nanoestructurados con MWCNTs (AuSPE/MWCNTs) según la estrategia 1 (—), estrategia 2 (—), estrategia 3 (—), estrategia 4 (—) y estrategia 5 (—). Para mayor claridad, los voltamperogramas correspondientes a las estrategias 3 y 4 se muestran en la figura 1.18B. Como se puede observar, en todos los casos, aparecen dos procesos redox parcialmente superpuestos, que se pueden adscribir a la presencia de los dos grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHS. Este comportamiento sólo se observa en electrodos serigrافيados. En electrodos de carbón vítreo solo se aprecia un proceso redox [Revenga-Parra, 2005].

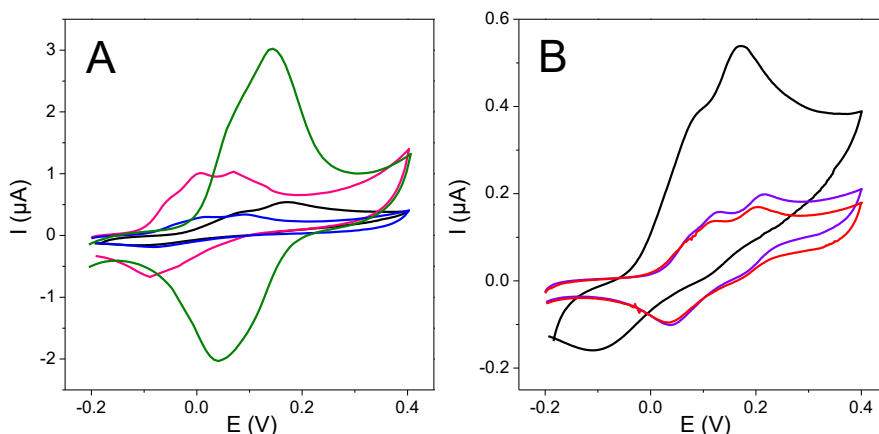


Fig. 1.18. Voltamperogramas cíclicos de AuSPEs antes (—) y tras la nanoestructuración según la estrategia 1 (—), estrategia 2 (—), estrategia 3 (—) y estrategia 4 (—) y estrategia 5 (—) modificados con 3,4-DHS en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10$  mV s<sup>-1</sup>.

Los potenciales de pico para cada una de las estrategias se recogen en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Potenciales de pico para AuSPEs/MWCNTs modificado con 3,4-DHS para las diferentes estrategias de nanoestructuración con MWCNTs.

<b>estrategia</b>	<b>E<sub>pa1</sub> (V)</b>	<b>E<sub>pa2</sub> (V)</b>	<b>E<sub>pc1</sub> (V)</b>	<b>E<sub>pc2</sub> (V)</b>
sin MWCNTs	0.09	0.17	-0.11	0.11
1	0.01	0.07	-0.09	-
2	0.02	0.09	-0.08	-
3	0.13	0.22	0.04	0.19
4	0.12	0.20	0.03	0.18
5	0.06	0.14	0.04	-

En las plataformas desarrolladas mediante las estrategias 1 y 2 el pico anódico se desplaza a potenciales más negativos que en el electrodo no nanoestructurado, al igual que para la estrategia 5, aunque en este caso el desplazamiento es mucho menor. El pico catódico se desplaza en los tres casos hacia potenciales más positivos. Este comportamiento concuerda con lo observado anteriormente con la sonda  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  en disolución y se puede explicar teniendo en cuenta la presencia de nanotubos y a la disposición alineada verticalmente de estos en las estrategias 1 y 2. La nanoestructuración mediante las estrategias 3 y 4 da lugar a un desplazamiento del par redox hacia potenciales más positivos. En este caso, como se observó en las imágenes de SEM (fig. 1.10 D y E), la cantidad de MWCNTs presente es muy pequeña y el desplazamiento en el potencial se puede atribuir a la capa de 4-ATP.

Por otro lado, la presencia de MWCNTs produce un aumento en el área específica de la superficie, que se vería reflejada en un aumento de la corriente de pico. La mayor intensidad se observa para las plataformas derivadas de la estrategia 5. Esto se debe a una mayor densidad de MWCNTs, como se pudo observar en las imágenes de SEM (fig. 1.10 F). En la estrategia 2 y, especialmente, en las estrategias 3 y 4, se observa una disminución de la corriente de pico, que se puede explicar por la presencia de la capa de 4-ATP, que dificulta la adsorción del 3,4-DHS, en el caso de las estrategias 3 y 4, más acusado debido a la escasez de MWCNTs a los que adsorberse.

A partir de la carga (Q) obtenida de la integración de la onda anódica de los voltamperogramas de AuSPEs/MWCNTs modificados con 3,4-DHS, se calculó el



recubrimiento superficial de 3,4-DHS usando la ecuación  $\Gamma = Q/n \cdot F \cdot A$ , donde  $A$  es el área electroactiva del electrodo y considerando que están involucrados en el proceso 4 electrones, según se describe en el apartado 4.1 de la sección materiales y métodos.

El área electroquímica se calculó, como se describe en el apartado 4.2 de la sección materiales y métodos, utilizando de la ecuación  $Q = 2n \cdot F \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot t^{1/2} \cdot \pi^{-1/2} \cdot A$  [Bard, 2001], donde la carga ( $Q$ ) se estimó a partir de medidas cronocolumbimétricas en presencia de  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Como coeficiente de difusión ( $D$ ) se utilizó el valor de  $0.632 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [Adams, 1969].

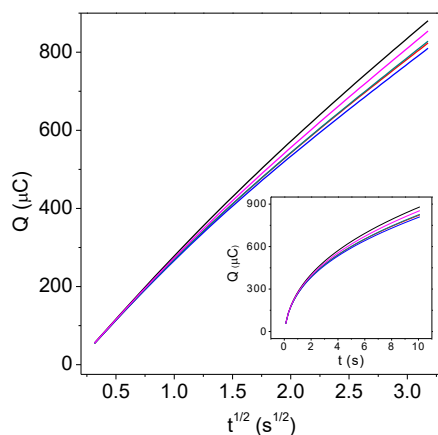


Fig. 1.19. Representación de la carga ( $Q$ ) frente a  $t^{1/2}$  o frente  $t$  (inserto) para la estimación del área electroquímica para AuSPE en  $K_3[Fe(CN)_6]$  5 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 con KCl 1 M para el electrodo no nanoestructurado.

En la tabla 1.4 aparecen recogidos los recubrimientos superficiales, así como las áreas electroactivas, para cada una de las estrategias empleadas.

Tabla 1.4. Recubrimiento superficial de 3,4-DHS adsorbido y área electroactiva de AuSPEs sin nanoestructurar o nanoestructurados con MWCNTs según las diferentes estrategias.

Estrategia	$\Gamma$ (mol cm <sup>-2</sup> )	A (cm <sup>2</sup> )
sin MWCNTs	$(5.8 \pm 0.1) \times 10^{-11}$	0.072
1	$(6.42 \pm 0.09) \times 10^{-11}$	0.097
2	$(1.18 \pm 0.05) \times 10^{-11}$	0.087
3	$(8.5 \pm 0.3) \times 10^{-12}$	0.072
4	$(7.5 \pm 0.2) \times 10^{-12}$	0.079
5	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-10}$	0.114

Como cabría esperar, el mayor recubrimiento se obtiene cuando se emplea la estrategia 5, que produce una gran área específica, mientras que para las estrategias 3 y 4 el recubrimiento obtenido es mucho más bajo debido a la capa de 4-ATP, que dificulta la adsorción del 3,4-DHS, como se comentó anteriormente.

### 1.3.2 Modificación de CSPEs con 3,4-DHS

En el caso de las plataformas desarrolladas basadas en electrodos serigrafados de carbono modificadas con nanotubos (CSPEs/MWCNTs), el comportamiento voltamperométrico tras la modificación con 3,4-DHS es similar al observado en el caso de los AuSPEs. En la figura 1.20 se muestran los voltamperogramas de CSPEs sin nanoestructurar (—) y nanoestructurados con MWCNTs según la estrategia 1 (—) y estrategia 5 (—).

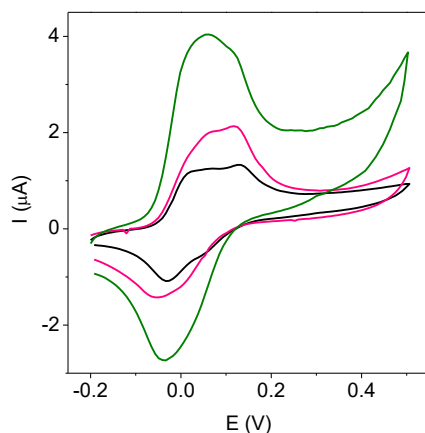


Fig. 1.20. Voltamperogramas cíclicos de CSPeS antes (—) y tras la nanoestructuración según la estrategia 1 (—) y estrategia 5 (—) modificados con 3,4-DHS en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

En este caso, también se observan los dos procesos redox superpuestos del 3,4-DHS. Sin embargo, no se observa desplazamiento de potencial (tabla 1.5), debido a la naturaleza carbonácea tanto del nanomaterial como del electrodo. La mayor intensidad se obtiene con la nanoestructuración según la estrategia 5, de nuevo debido a la mayor densidad de MWCNTs.

Tabla 1.5. Potenciales de pico para CSPeS/MWCNTs modificado con 3,4-DHS para las diferentes estrategias de nanoestructuración con MWCNTs.

estrategia	$E_{pa1} \text{ (V)}$	$E_{pa2} \text{ (V)}$	$E_{pc} \text{ (V)}$
sin MWCNTs	0.02	0.13	-0.03
1	0.06	0.12	-0.05
5	0.06	0.11	-0.04

Al igual que para los AuSPEs, se calculó el recubrimiento superficial a partir de la carga obtenida de la integración de la onda anódica de los voltamperogramas de CSPeS/MWCNTs modificados con 3,4-DHS y del área electroactiva estimada por cronocolumbimetría. En la tabla 1.6 aparecen recogidos los recubrimientos superficiales, así como las áreas electroactivas, para cada una de las estrategias empleadas.

Tabla 1.6. Recubrimiento superficial de 3,4-DHS adsorbido y área electroactiva de CSPEs sin nanoestructurar o nanoestructurados con MWCNTs según las diferentes estrategias.

Estrategia	$\Gamma$ (mol cm <sup>-2</sup> )	A (cm <sup>2</sup> )
sin MWCNTs	$(7.8 \pm 0.2) \times 10^{-11}$	0.060
1	$(9.5 \pm 0.1) \times 10^{-11}$	0.082
5	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-10}$	0.108

El mayor recubrimiento se obtiene también para la estrategia 5, debido a la mayor área creada por los MWCNTs. La presencia de MWCNTs en las plataformas desarrolladas mediante la estrategia 1 provoca también un aumento en el área superficial al comparar con el electrodo no nanoestructurado.

En vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que no solo la presencia de MWCNTs inmovilizados sobre la superficie del electrodo, sino también su distribución y configuración, influyen de manera significativa en el comportamiento voltamperométrico final de las especies redox tanto en disolución ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ) como confinadas en la superficie (3,4-DHS).

#### 1.4 Propiedades electrocatalíticas de las plataformas SPE/MWCNTs/3,4-DHS

Como se ha comentado anteriormente, el propósito fundamental del desarrollo de las plataformas basadas en la nanoestructuración de los electrodos con MWCNTs y con 3,4-DHS es la aplicación de estas plataformas en la construcción de dispositivos sensores frente a la oxidación de analitos de interés. Las moléculas que contienen en su estructura grupos o-quinona, como el 3,4-DHS, presentan una fuerte actividad electrocatalítica frente a la electrooxidación de NADH [Pariente, 1994; Pariente, 1996], de ácido ascórbico [Moreno, 2000] y de hidrazina [Wang, 1996a; Golabi, 1999b; Golabi, 1999a; Golabi, 2001; Revenga-Parra, 2005]. Por este motivo, se han estudiado las propiedades electrocatalíticas de los electrodos nanoestructurados con MWCNTs mediante las diferentes estrategias y, posteriormente, con 3,4-DHS en la electrooxidación de NADH e hidrazina.

### 1.4.1 Oxidación electrocatalítica de NADH

El NADH es la forma reducida del  $\beta$ -Nicotinamida Adenina Dinucleótido y se conoce como NAD<sup>+</sup> en su forma oxidada. Es parte de un sistema redox que juega un papel importante en la transferencia electrónica en enzimas oxidorreductasas. La estructura de este cofactor enzimático está formada por dos nucleótidos, la adenina y la nicotinamida, unidos por un puente difosfato (figura 1.21). Entre ellos, la nicotinamida es la responsable de las propiedades redox de este compuesto y actúa como mediador en numerosos sistemas biológicos. El par NAD<sup>+</sup>/NADH está involucrado en más de 300 reacciones enzimáticas catalizadas por deshidrogenasas y la semirreacción de este sistema implica la transferencia de dos electrones y un protón (figura 1.21).

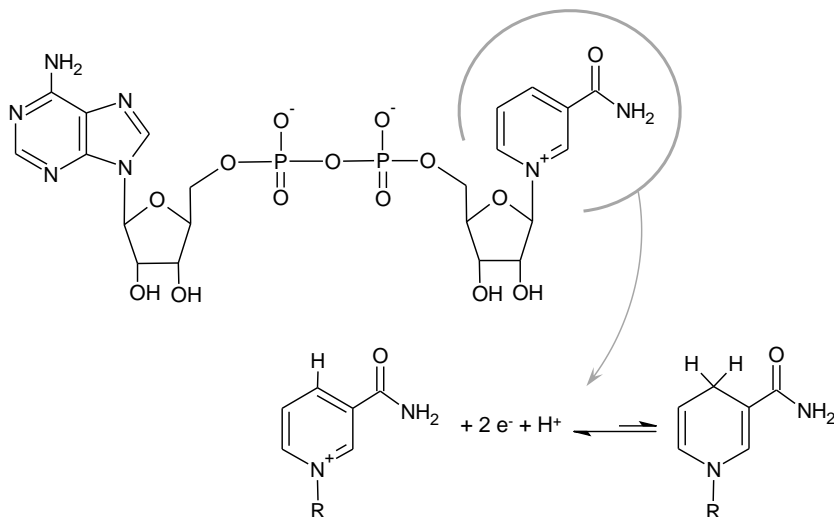



Fig. 1.21. Representación esquemática del cofactor NAD<sup>+</sup> y reacción de reducción del sistema NAD<sup>+</sup>/NADH.

La cuantificación de este cofactor es importante para estudios de procesos biológicos, así como para el desarrollo de herramientas analíticas utilizadas en control de calidad alimentario, ambiental o en laboratorios clínicos. La oxidación de NADH es un proceso de gran interés en el campo de los biosensores, ya que permite la determinación indirecta de los sustratos de las enzimas deshidrogenasas, a través de la cuantificación del NADH generado en la reacción enzimática. Sin embargo, la

oxidación directa de NADH en la superficie de electrodos clásicos requiere un alto sobrepotencial debido a su alta energía de activación. A pH 7.0 el potencial termodinámico para esta reacción es -0.56 V frente al electrodo de calomelanos. Sin embargo, en electrodos de carbono, platino y oro la oxidación de NADH tiene lugar a potenciales cercanos a +0.4 V, +0.7 V y +1.0 V (frente al electrodo de calomelanos), respectivamente [Samec, 1983]. En electrodos serigrafiados de oro (AuSPEs) esta oxidación sucede a potenciales por encima de 0.4 V (figura 1.22A ). Además, durante la oxidación de NADH se produce un envenenamiento de la superficie debido a la acumulación de los productos de la oxidación, lo que provoca una disminución de la respuesta electroquímica. Una manera de evitar estos inconvenientes es la modificación de la superficie del electrodo con compuestos que actúen como mediadores redox. De esta manera se mejora la transferencia electrónica y se reduce el sobrepotencial, a la vez que se puede minimizar la adsorción de sustancias sobre la superficie del electrodo. Por este motivo, existe un gran interés en el desarrollo de nuevas modificaciones electrónicas con propiedades electrocatalíticas hacia la oxidación de NADH con el objeto de mejorar las propiedades analíticas de los dispositivos sensores.

En este sentido, las quinonas son una familia de compuestos que presentan unas propiedades ideales para su aplicación como electrocatalizadores en la oxidación de NADH, especialmente las *o*-quinonas [Carlson, 1985]. Tse y Kuwana describieron por primera vez la actividad electrocatalítica frente a la oxidación de NADH de un electrodo de grafito pirolítico modificado covalentemente con *o*-quinonas, concretamente con 3,4-dihidroxibencilamina y dopamina [Tse, 1978]. Desde entonces se han empleado diferentes *o*-quinonas para conseguir reducir el sobrepotencial al que se produce la oxidación de NADH, como 3,4 y 2,5-dihidroxibenzaldehído [Pariente, 1994; Pariente, 1996], catecol [Maleki, 2012] o 1,4-bis(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutano [Ciszewski, 2000].

Por otra parte, los nanotubos de carbono se han utilizado como modificadores de electrodos en el desarrollo de sensores de NADH [Musameh, 2002; Chen, 2004] ya que, además de las propiedades generales de los nanomateriales, presentan propiedades electrocatalíticas frente a la oxidación de este compuesto, a la vez que

inhiben la adsorción de especies sobre la superficie del electrodo. Por tanto, la combinación de las propiedades electrocatalíticas de las o-quinonas junto con las propiedades que aportan los nanotubos de carbono puede generar plataformas electrocatalíticas sensibles y robustas para su aplicación como sensores de NADH.

La figura 1.22 muestra los voltamperogramas cíclicos de AuSPEs antes (A) y tras la nanoestructuración según la estrategia 1 (B), estrategia 2 (C), estrategia 3 (D), estrategia 4 (E) y estrategia 5 (F) en presencia de NADH 1 mM. Como se puede apreciar, la presencia de MWCNTs en las plataformas desarrolladas produce una disminución en el potencial de oxidación del NADH (—) cuando se comparan con los AuSPEs no nanoestructurados. En el caso de las estrategias 3 y 4, al igual que para los electrodos no nanoestructurados, no se observa el pico de oxidación en la ventana de potencial estudiada.

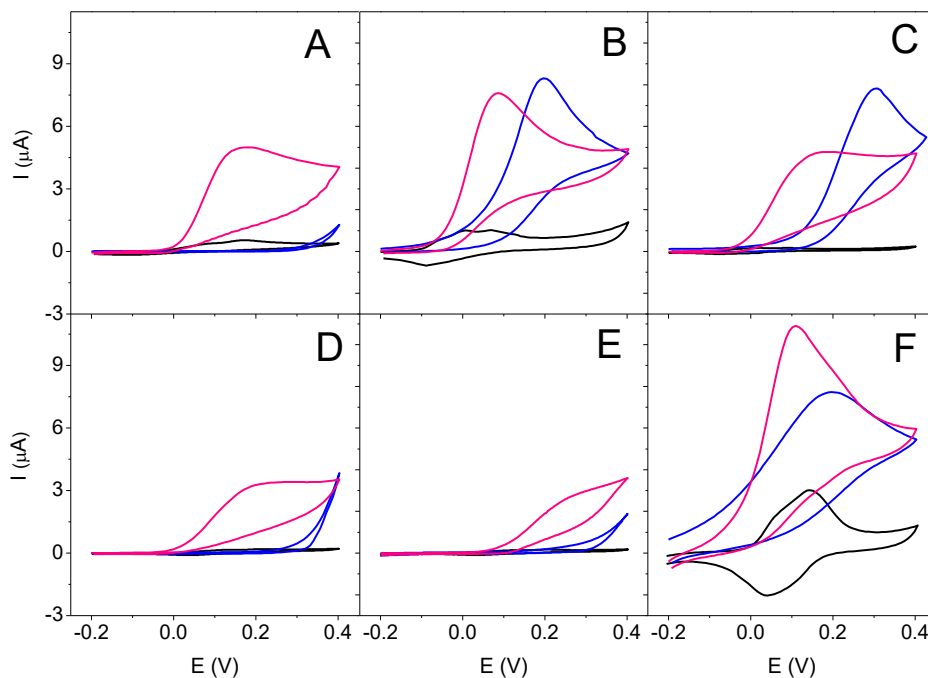


Fig. 1.22. Voltamperogramas cíclicos de AuSPEs antes (A) y tras la nanoestructuración según la estrategia 1 (B), estrategia 2 (C), estrategia 3 (D), estrategia 4 (E) y estrategia 5 (F) sin modificar (—) y modificados con 3,4-DHS en presencia (—) y en ausencia (—) de NADH 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Cuando además se modifican con 3,4-DHS ( $\text{—}$ ), aparecen los dos procesos redox característicos adscritos a los grupos quinona/hidroquinona comentados anteriormente. La modificación con 3,4-DHS provoca la oxidación electrocatalítica de NADH ( $\text{—}$ ) a potenciales más bajos, cuando se compara con las plataformas AuSPEs/MWCNTs sin 3,4-DHS, especialmente, las plataformas derivadas de la estrategia 1. Los potenciales de pico para la oxidación de NADH se recogen en la tabla 1.7.

Tabla 1.7. Potenciales de pico de oxidación de NADH para AuSPEs/MWCNTs modificado o no con 3,4-DHS para las diferentes estrategias de nanoestructuración con MWCNTs.

estrategia	-	3,4-DHS
	$E_p$ (V)	$E_p$ (V)
sin MWCNTs	> 0.4	0.17
1	0.20	0.09
2	0.30	0.12
3	> 0.4	0.19
4	> 0.4	0.25
5	0.20	0.15

En el caso de las estrategias 3 y 4, la oxidación de NADH se produce a potenciales más altos que en ausencia de MWCNTs, probablemente debido a la presencia de la capa de 4-ATP, a la pequeña cantidad de MWCNTs presentes y al bajo recubrimiento de 3,4-DHS. Por otro lado, las plataformas derivadas de la adsorción directa (estrategia 5) dan lugar a las corrientes catalíticas más altas, como cabría esperar debido al alto recubrimiento obtenido. Sin embargo, en este caso la eficiencia catalítica, definida como el cociente entre la intensidad de corriente en presencia y en ausencia del analito, es menor que para la estrategia 1 (tabla 1.8).



Tabla 1.8. Eficiencia catalítica en la oxidación de NADH para las plataformas AuSPEs/MWCNTs modificadas con 3,4-DHS para las diferentes estrategias de nanoestructuración con MWCNTs.

<b>estrategia</b>	<b>eficiencia catalítica</b>
sin MWCNTs	$9.2 \pm 0.6$
1	$7.8 \pm 0.3$
2	$13 \pm 1$
3	$15 \pm 2$
4	$14 \pm 3$
5	$3.6 \pm 0.4$

Existen tres factores importantes a la hora de decidir cuál es la mejor plataforma electrocatalítica: la corriente catalítica, el potencial de pico y la eficiencia catalítica. En este caso, y teniendo en cuenta los tres factores, se puede concluir que la estrategia 1 para la incorporación de los nanotubos, combinada con la modificación con 3,4-DHS es la mejor opción para el desarrollo de plataformas electrocatalíticas para la oxidación de NADH.

#### 1.4.1.1 Determinación del coeficiente de difusión y de la constante catalítica para NADH

Se han calculado tanto el coeficiente de difusión del NADH como la constante catalítica del proceso ( $k$ ) mediante cronoamperometría a 0.19 V, siguiendo los procedimientos descritos en el capítulo de materiales y métodos. De las pendientes de las representaciones de  $I_{\text{CAT}}$  frente a  $t^{1/2}$  obtenidas durante la oxidación de concentraciones crecientes de NADH sobre las plataformas nanoestructuradas desarrolladas según la estrategia 1 y modificadas con 3,4-DHS, se obtuvo un valor para el coeficiente de difusión ( $D$ ) de NADH de  $(1.7 \pm 0.6) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Este valor es cercano al publicado previamente para este cofactor en soluciones tampón fosfato  $(2.4 \pm 0.6) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [Moiroux, 1980] en electrodos sin nanoestructurar.

La constante catalítica para la reacción entre el NADH y la plataforma electrocatalítica desarrollada se evaluó usando el procedimiento descrito por Galus [Galus, 1991]. En la figura 1.23 se muestran los valores de  $I_{\text{CAT}}/I_D$  respecto a la raíz cuadrada del tiempo

de medida para distintas concentraciones de NADH. La representación de las pendientes de las rectas obtenidas frente a la raíz cuadrada de la concentración (fig. 1.23 inserto) da lugar a una nueva recta de cuya pendiente se obtiene la constante catalítica. En este caso, se obtuvo un valor de  $(1.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

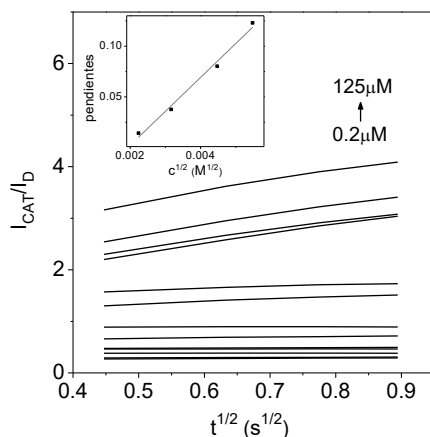


Fig. 1.23. Representación de  $I_{\text{CAT}}/I_{\text{D}}$  frente a  $t^{1/2}$  para NADH sobre AuSPEs/MWCNTs según la estrategia 1 y modificada con 3,4-DHS. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

Este valor confirma que las plataformas desarrolladas por nanoestructuración de AuSPEs mediante la estrategia 1 en combinación con 3,4-DHS presentan un alto poder catalítico frente a la oxidación de NADH. Sin embargo, el valor de la constante es inferior a los encontrados en la bibliografía para electrodos nanoestructurados con CNTs. Por ejemplo, el trabajo de Lin y colaboradores [Lin, 2012] en el que se describe la modificación de un electrodo de carbón vítreo con poliluminol y MWCNTs funcionalizados con grupos carboxílicos, con una  $k$  de  $2.19 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , o el de Karimi-Maleh y colaboradores [Karimi-Maleh, 2014], donde se describe la modificación con un complejo de rutenio, óxido de zinc y MWCNTs de un electrodo de pasta de carbono, con una  $k$  de  $4.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . No obstante, en ambos casos el potencial aplicado es mucho mayor que en el sensor desarrollado.

### 1.4.1.2 Propiedades analíticas del sensor de NADH

Las propiedades analíticas como sensor de NADH de la plataforma electrocatalítica desarrollada mediante nanoestructuración de AuSPEs con nanotubos siguiendo la estrategia 1 en combinación con 3,4-DHS se obtuvieron a partir de medidas cronoamperométricas de un solo potencial en disoluciones sin agitar y conteniendo concentraciones crecientes de NADH. Se aplicó un pulso de potencial desde -0.60 V hasta 0.19 V. El criterio de elección de estos potenciales se basa en la variación desde un potencial donde no exista reacción faradaica a otro en el que la oxidación de NADH se considere completa. Los cronoamperogramas se registraron en disolución no agitada para asegurar control difusional del analito a la superficie del electrodo.

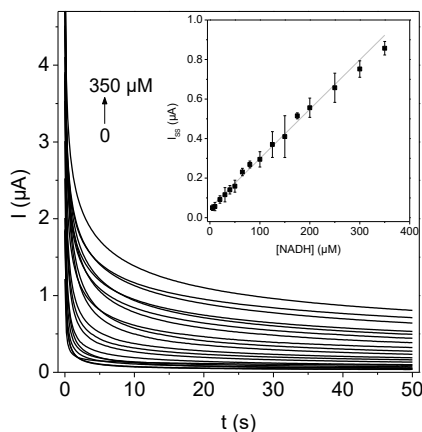


Fig. 1.24. Cronoamperogramas de la oxidación de NADH en la plataforma AuSPEs/MWCNTs modificada con 3,4-DHS en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Inserto: Corriente en el estado estacionario ( $I_{ss}$ ) a 45 segundos frente a la concentración de NADH.

En la figura 1.24 se muestran los cronoamperogramas correspondientes a concentraciones crecientes de NADH en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0. Se puede observar cómo se estabiliza la corriente de estado estacionario ( $I_{ss}$ ) a los pocos segundos de aplicar el pulso de potencial. La representación de  $I_{ss}$  frente a la concentración de NADH produce una respuesta lineal en el intervalo de concentración

de 5.0 a 350  $\mu\text{M}$ . Estos resultados revelan que la nueva plataforma electrocatalítica puede utilizarse como sensor de NADH en estas condiciones.

Los parámetros analíticos del método desarrollado se estimaron a partir tramo lineal de la curva de calibrado. Los datos se recogen en la tabla 1.9. La sensibilidad obtenida a partir de la pendiente del tramo lineal fue de  $(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-3} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación se calcularon como la concentración que da una señal igual a tres o diez veces la desviación estándar de la corriente del blanco, respectivamente. La corriente del blanco se determinó a partir de tres electrodos modificados con MWCNTs y 3,4-DHS en las mismas condiciones de medida en ausencia de analito. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron  $3.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$  y  $8.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La reproducibilidad se ha calculado para 3 electrodos distintos y se ha expresado como porcentaje de desviación estándar relativa (R.S.D.%). Se considera que un método es reproducible cuando este valor es inferior al calculado para el coeficiente de variación de Horwitz ( $CV_H$ ) para una concentración determinada [Wood, 1999]. El  $CV_H$  se calcula según la ecuación:

$$CV_H = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

donde C representa la concentración.

Para una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , el valor calculado de  $CV_H$  es 10.2. Este valor es superior al obtenido experimentalmente de 8.8, por lo que se puede asegurar que el sensor desarrollado presenta una buena reproducibilidad.

Tabla 1.9. Parámetros analíticos obtenidos para la oxidación electrocatalítica de NADH sobre las plataformas AuSPEs/MWCNTs preparadas mediante la estrategia 1 en combinación con 3,4-DHS.

Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{M}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)	Estabilidad
3.4	8.1	5.0-350	$2.5 \times 10^{-3}$	8.8	92% 15 min

El sensor de NADH desarrollado presenta unos parámetros analíticos similares o mejores al comparar con otros sensores de NADH basados en electrodos modificados con nanotubos recogidos en la bibliografía en cuanto a sensibilidad ( $(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-3} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ ) y límites de detección ( $3.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ) y cuantificación ( $8.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ). En el trabajo de Yuan y colaboradores [Yuan, 2011] se describe un sensor de NADH basado en la modificación de un electrodo de carbón vítreo distribuyendo sobre el electrodo un compósito de MWCNTs y el péptido difenilalanina, con un límite de detección de  $10 \mu\text{M}$  y en el trabajo de Filip y colaboradores [Filip, 2011] se describe otro sensor de NADH basado en la modificación de un electrodo de carbón vítreo con una dispersión de SWCNTs en ácido hialurónico, con un límite de detección de  $63 \mu\text{M}$ . Gasnier y colaboradores [Gasnier, 2012] describen un sensor de NADH basado la modificación de un electrodo de carbón vítreo mediante deposición una dispersión de MWCNTs en una solución de polietilenimina funcionalizada con dopamina, con un límite de detección de  $3 \mu\text{M}$  y un intervalo lineal hasta  $100 \mu\text{M}$ . En todos los casos, la modificación del electrodo con los CNTs se realiza mediante adsorción física. La nanoestructuración covalente mediante electroinjerto de sales de diazonio se espera que produzca plataformas con una gran estabilidad.

En el proceso de oxidación del NADH se generan especies resultantes de reacciones de dimerización y desprotonación [Lorenzo, 1998; Blaedel, 1976], que pueden depositarse sobre el electrodo inactivándolo. Uno de los retos cuando se desarrollan sensores electroquímicos, especialmente de NADH, es obtener diseños con estabilidad operacional a largo plazo que hagan posibles determinaciones sucesivas sin pasivación de la superficie. La utilización de nanomateriales en estos diseños favorece su estabilidad al dificultar la adsorción de los productos de la reacción sobre la superficie del electrodo.

La estabilidad operacional del sensor desarrollado se evaluó tras 15 minutos de trabajo continuo en presencia de NADH  $1.0 \text{ mM}$ . Se obtuvo una respuesta del 92%, confirmando que el electrodo sufre un mínimo envenenamiento.

Igualmente, se estudió también la estabilidad del sensor desarrollado tras su almacenamiento a temperatura ambiente durante tres semanas. El sensor mantuvo el 100% de su actividad frente a una concentración de NADH  $1.0 \text{ mM}$  en tampón fosfato

0.1 M a pH 7.0 durante todo este periodo, gracias a la unión covalente de los MWCNTs a la superficie del electrodo.

### 1.4.2 Oxidación electrocatalítica de hidrazina

La hidrazina es un compuesto químico formado por nitrógeno e hidrógeno ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) con extensas aplicaciones en una gran variedad de áreas como la química industrial, militar, agricultura y farmacológica. Por ejemplo, destaca por ser un importante material anódico utilizado en celdas de combustible o como propulsor de cohetes en la industria aeroespacial [Yamada, 2003]. Además, se emplea en procesos industriales como inhibidor de la corrosión, catalizador o emulsionante [Amlathe, 1988; Vernot, 1985], aunque también como antioxidante, reductor, revelador de fotos o en la producción de insecticidas. En el lado negativo, la hidrazina es un compuesto corrosivo, irritante y tóxico, catalogado como potencial carcinógeno, mutágeno y hepatotóxico, que puede causar daño en hígado y riñones [Becker, 1981]. Por todo ello, es un analito de interés biológico y medioambiental.

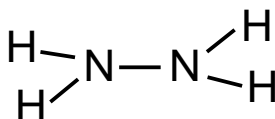
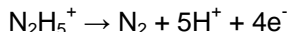


Fig. 1.25. Estructura de la hidrazina.

Debido a la importancia de su determinación, se ha descrito una gran variedad de métodos para ello basados en técnicas como la espectrofotometría [Ganesh, 2012; Safavi, 1995], cromatografía [Smolenkov, 2012; Elias, 2006; Kirchherr, 1993], fluorescencia [Collins, 1994] o coulombimetría [Pastor, 1983], entre otros. Estos métodos requieren de tratamientos de la muestra extensos, tediosos y caros, por lo que los sensores electroquímicos se presentan como una alternativa para la determinación de hidrazina debido a su elevada sensibilidad, selectividad y rapidez.

Generalmente, la determinación de hidracina mediante técnicas electroquímicas se basa en su oxidación sobre la superficie del electrodo. Teniendo en cuenta que el  $\text{pK}_a$  de la hidrazina es 7.9 [Adams, 1963], a pH menor de 8.0 la forma predominante será

la protonada, es decir,  $\text{N}_2\text{H}_5^+$ . En estas condiciones, la oxidación de hidrazina en medio acuoso es un proceso que implica la transferencia de cinco protones y cuatro electrones:



El potencial termodinámico para la semirreacción de la hidrazina es -0.21 V frente al electrodo normal de hidrogeno [Bard, 1985]. En electrodos de carbono, la oxidación de hidrazina presenta un gran sobrepotencial; a pH 7 para electrodos de carbón vítreo la oxidación de hidrazina sucede a 0.8 V [Ahmar, 2013]. Cuando se utilizan electrodos serigrafiados de carbono (figura 1.26A —), tiene lugar a potenciales por encima de 0.5 V. Con la finalidad de reducir este sobrepotencial se ha descrito el uso de diferentes mediadores redox, tales como el ácido cafeico [Golabi, 1999a], el ácido clorogénico [Golabi, 1999b], el pirocatecol violeta [Golabi, 2001], el 3,4-dihidroxibenzaldehído [Pamidi, 1996] y también el 3,4-DHS [Revenga-Parra, 2005]. En todos ellos, la actividad redox proviene del grupo funcional quinona/hidroquinona.

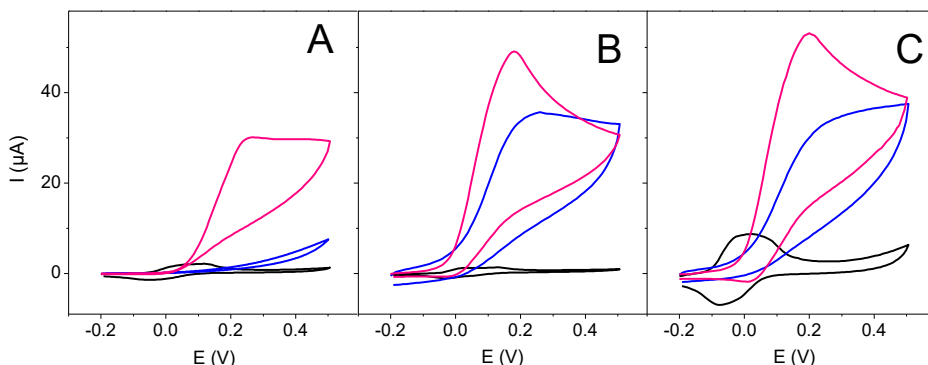


Fig. 1.26. Voltamperogramas cíclicos de CSPEs antes (A) y tras la nanoestructuración según la estrategia 1 (B) y estrategia 5 (C) sin modificar (—) y modificados con 3,4-DHS en presencia (—) y en ausencia (—) de hidrazina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 1.26 se pueden ver los voltamperogramas cíclicos de CSPEs antes (A) y tras la nanoestructuración según las estrategias 1 (B) y 5 (C) en presencia de hidrazina 1 mM. En ella se puede observar que la oxidación de hidrazina en las plataformas desarrolladas con MWCNTs (—) tiene lugar a potenciales más bajos (ver

tabla 1.10) que cuando se utiliza el electrodo no nanoestructurado, donde no se observa el pico de oxidación en la ventana de potencial estudiada. La posterior modificación con 3,4-DHS provoca la aparición de los dos procesos redox característicos (—), como se ha visto anteriormente. La presencia de hidrazina produce la aparición de una corriente catalítica (—), como se puede observar por el aumento de la corriente de oxidación y la desaparición del pico de reducción.

Tabla 1.10. Potenciales de pico de oxidación de hidrazina para CSPEs/MWCNTs modificado o no con 3,4-DHS para las diferentes estrategias de nanoestructuración con MWCNTs.

estrategia	-	3,4-DHS	eficiencia catalítica
	$E_p$ (V)	$E_p$ (V)	
sin MWCNTs	> 0.5	0.25	$14 \pm 1$
1	0.22	0.18	$33 \pm 2$
5	0.23	0.20	$6 \pm 1$

Al igual que se observó en el caso de las plataformas basadas en AuSPEs para la catálisis de NADH, la nanoestructuración mediante la estrategia 1 en combinación con 3,4-DHS produce la mejor plataforma electrocatalítica para la oxidación de hidrazina cuando se tienen en cuenta la corriente catalítica, el potencial de pico y la eficiencia catalítica.

#### 1.4.2.1 Determinación del coeficiente de difusión y de la constante catalítica para hidrazina

Siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo de materiales y métodos, al igual que en el caso de AuSPEs/MWCNTs con 3,4-DHS para NADH, se calculó el coeficiente de difusión (D) para la plataforma CSPEs/MWCNTs preparada mediante la estrategia 1 (diazotación y electroinjerto de MWCNTs-NH<sub>2</sub>) en combinación con 3,4-DHS para hidrazina. En este caso, el valor calculado fue de  $(2.56 \pm 0.06) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Este valor concuerda con el encontrado en la bibliografía para disolución tampón fosfato ( $2.37 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) [Ardakani, 2008].



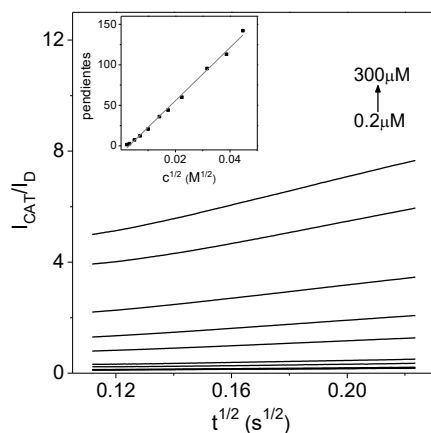


Fig. 1.27. Representación de  $I_{CAT}/I_D$  frente a  $t^{1/2}$  para hidrazina sobre CSPEs/MWCNTs según la estrategia 1 y modificada con 3,4-DHS. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

De igual manera, utilizando el método de Galus, se calculó la constante catalítica para la oxidación de hidrazina sobre la plataforma electrocatalítica desarrollada. En la figura 1.27 se pueden observar las rectas de  $I_{CAT}/I_D$  frente a  $t^{1/2}$  para las distintas concentraciones de hidrazina. En el inserto se muestra la recta que se obtiene al representar las pendientes de las rectas anteriores frente a la concentración de hidrazina, de cuya pendiente se obtiene la constante catalítica. En este caso, el valor obtenido es  $(2.93 \pm 0.04) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor tan alto confirma que las plataformas desarrolladas presentan una capacidad catalítica muy elevada, como queda de manifiesto al comparar con otros valores de  $k$  reportados en la bibliografía, como los descritos por Adekunle y colaboradores para electrodos de grafito pirolítico activado modificados con CNTs y electrodecorados con películas metálicas y de óxidos de metales:  $2.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para SWCNTs-Ni,  $2.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para SWCNTs-Fe,  $0.24 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para SWCNTs-Co [Adekunle, 2008] y  $7.67 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para MWCNTs-Ni [Adekunle, 2010b] o por Ensafi y colaboradores [Ensafi, 2012] para electrodos de pasta de carbono y MWCNTs modificados con *p*-aminofenol:  $4.93 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . En todos los casos la  $k$  calculada es varios órdenes de magnitud menor que la obtenida con la plataforma electrocatalítica desarrollada, lo que pone de manifiesto el gran poder catalítico de esta.

### 1.4.2.2 Propiedades analíticas del sensor de hidrazina

Se estudió también la respuesta del sensor de hidrazina mediante cronoamperometría. Los cronoamperogramas de las plataformas basadas en electrodos serigrafiados de carbono nanoestructurados con nanotubos de carbono y 3,4-DHS a concentraciones crecientes de hidrazina en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0 se muestran en la figura 1.28. En este caso se aplicó un pulso de potencial desde -0.60 V hasta 0.26 V. La estabilización de la corriente de estado estacionario ( $I_{ss}$ ) fue rápida. Se obtuvo una respuesta lineal (figura 1.28 inserto) en el intervalo de concentraciones entre 0.01 y 2.0 mM, lo que demuestra que las nuevas plataformas sensoras se pueden utilizar como sensores de hidrazina.

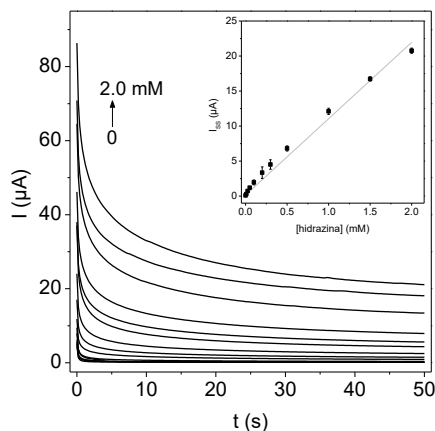


Fig. 1.28. Cronoamperogramas de la oxidación de hidrazina en la plataforma CSPEs/MWCNTs modificada con 3,4-DHS en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Inserto: Corriente en el estado estacionario ( $I_{ss}$ ) a 45 segundos frente a la concentración de hidrazina.

En la tabla 1.11 se recogen los parámetros analíticos obtenidos. La sensibilidad ( $1.90 \pm 0.01 \times 10^{-2} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ ) y los límites de detección ( $6.0 \pm 0.6$ )  $\mu\text{M}$  y cuantificación ( $19.0 \pm 0.6$ )  $\mu\text{M}$  son comparables a los de otros sensores de hidrazina basados en plataformas modificadas con CNTs, como el descrito por Coates y colaboradores [Coates, 2013], que consiste en la modificación de un electrodo de carbono vítreo mediante la adsorción de SWCNTs, electroinjerto de la sal de 4-azidobencenodiazonio, que reacciona con etilpiridina y posteriormente se une

ftalocianina de hierro mediante enlace axial con el grupo piridina, o los descritos por Adekunle y colaboradores, que consisten en un electrodo de grafito pirolítico activado modificado por adsorción con SWCNTs y nanopartículas de azul de Prusia [Adekunle, 2010a] o en un electrodo de grafito pirolítico activado modificado por adsorción con SWCNTs y electrodecorado con metales (Ni, Fe y Co) [Adekunle, 2008], donde los límites de detección se encuentran en un intervalo 1.1-6.1  $\mu\text{M}$ . El sensor propuesto es un método más sencillo y rápido, para el que cabe destacar su amplio intervalo de respuesta.

Tabla 1.11. Parámetros analíticos obtenidos para la oxidación electrocatalítica de hidrazina sobre las plataformas CSPEs/MWCNTs preparadas mediante la estrategia 1 en combinación con 3,4-DHS.

Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)	Estabilidad
6.0	19.0	0.01-2	$1.9 \times 10^{-2}$	4.5	99% 15 min

La reproducibilidad se calculó de igual manera que en el caso anterior. El R.S.D. obtenido para la concentración de 20  $\mu\text{M}$  es de 4.5 %, inferior al valor calculado de  $\text{CV}_H$ , 10.2 [Wood, 1999]. Esto asegura que el sensor desarrollado a partir de CSPEs nanoestructurados con MWCNTs mediante la estrategia 1 y modificados con 3,4-DHS para la determinación de hidrazina presenta una buena reproducibilidad.

Se evaluó también la estabilidad operacional, obteniéndose tan solo una disminución en la respuesta del 1% tras 15 minutos de trabajo continuo en presencia de hidrazina 1.0 mM.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que las plataformas sensoras desarrolladas a partir de electrodos serigrafados nanoestructurados con MWCNTs- $\text{NH}_2$  mediante diazotación y electroinjerto, en combinación con 3,4-DHS presentan las características adecuadas para su utilización como sensor electroquímico para la determinación de NADH e hidrazina, con buenos límites de detección y amplios intervalos lineales.

## Capítulo 2

---



## 2. Reducción y modificación química de grafeno en un solo paso para el desarrollo de plataformas (bio)electrocatalíticas

---

El objetivo de este capítulo es la modificación química de un nanomaterial para la nanoestructuración de electrodos y su uso como plataformas electrocatalíticas para el desarrollo de sensores. En este caso, al igual que en el capítulo anterior, se va a utilizar un nanomaterial perteneciente a la familia del carbono: el grafeno.

El grafeno es un material que despierta mucho interés debido a sus propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas y ópticas. El método de síntesis más habitual del grafeno se basa en la reducción de óxido de grafeno, cuya obtención es sencilla a partir de la oxidación de grafito. El óxido de grafeno presenta una baja conductividad eléctrica debido a que el sistema  $\pi$ -conjugado se encuentra alterado, como consecuencia del proceso de oxidación. Esta conductividad se puede recuperar mediante la restauración de la red  $\pi$ , por lo que la reducción del GO es una reacción de una gran importancia.

Un aspecto interesante sobre el grafeno es la posibilidad de modular sus propiedades mediante modificación con moléculas activas en algún modo. La modificación covalente puede provocar cambios en la estructura electrónica del grafeno y reducir la conductividad eléctrica, mientras que la modificación no covalente minimiza el daño en la red  $sp^2$ , por lo que altera menos sus propiedades.

En este capítulo se describe la reducción de óxido de grafeno (GO) utilizando como reductor el 3,4-DHS. Este ligando, no solo es capaz de reducir el óxido de grafeno, sino que se adsorbe sobre la superficie del grafeno reducido, de manera que este queda modificado. El material híbrido formado presenta propiedades electrocatalíticas frente a la oxidación de hidrazina al ser depositado sobre electrodos serigrafados de carbono. Además, es capaz de actuar como mediador redox inmovilizado en la catálisis enzimática de lactato producida por la enzima lactato oxidasa.

## 2.1 Interacción de óxido de grafeno con 3,4-DHS

Como se ha comentado con anterioridad, el 3,4-DHS presenta anillos aromáticos en su estructura, es decir, grupos planares, que podrían interaccionar con los anillos aromáticos del óxido de grafeno mediante unión no covalente. Por este motivo, se ha estudiado la interacción entre GO y 3,4-DHS mediante espectrofotometría de absorción UV-visible y de emisión.

En primer lugar, se registró el espectro de absorción del GO. La suspensión de GO se sonicó antes de su utilización para asegurar que el material de partida se encuentra exfoliado en forma de óxido de grafeno.

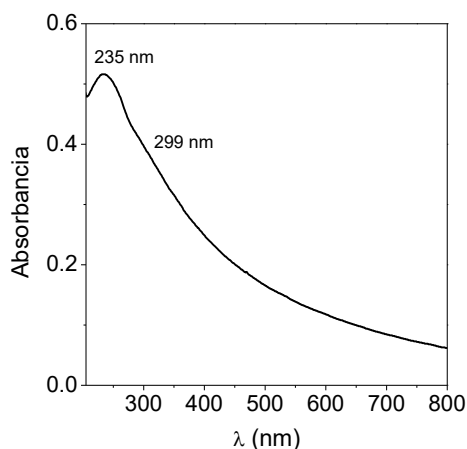


Fig. 2.1. Espectro de absorción de una suspensión de GO  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

Como se puede observar en la figura 2.1, el GO presenta una banda de absorción a 235 nm, que está asociada a la transición  $\pi-\pi^*$  del doble enlace C=C y un hombro a 299 nm, asociado a la transición  $n-\pi^*$  del C=O [Luo, 2009], características del óxido de grafeno.

De igual manera, se registró el espectro de absorción del 3,4-DHS. El 3,4-DHS es una molécula fluorescente [Revenga-Parra, 2007], por lo que se registraron también los espectros de emisión. A pH 7.0, las moléculas de 3,4-DHS se encuentran en su forma neutra, es decir las iminas están desprotonadas ( $\text{pK}_{\text{aNH}}=4.88$ ) y los hidroxilos, protonados ( $\text{pK}_{\text{aOH}}=8.99$ ) [Abad, 2011].

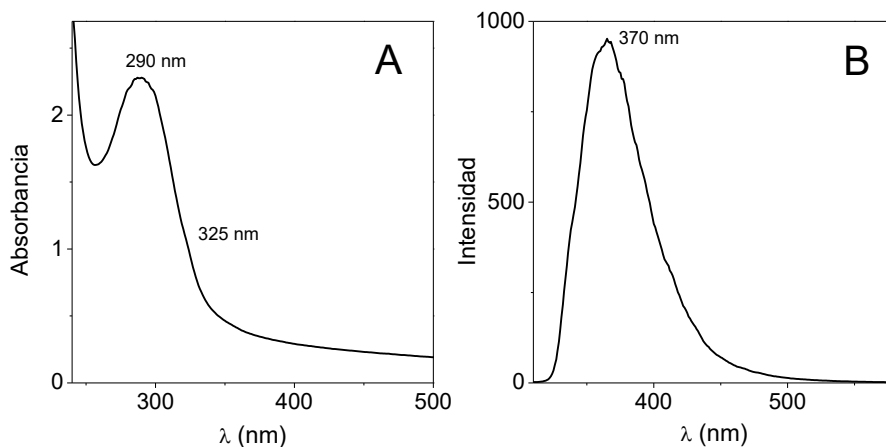


Fig. 2.2. Espectros de absorción (A) y emisión ( $\lambda_{\text{ex}}=290$  nm) (B) de una disolución que contiene 3,4-DHS 100  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

El espectro de absorción (figura 2.2A) presenta una banda de absorción intensa a 290 nm, asociada a las transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$  de los grupos fenólicos y otra banda a 325 nm, asociada a las transiciones  $n\text{-}\pi^*$  de los grupos imina y anillos aromáticos [Abad, 2011].

En el espectro de emisión (figura 2.2B) se puede observar una banda centrada a 370 nm, cuando se utiliza una longitud de onda de excitación de 290 nm.

Se estudió espectrofotométricamente la interacción entre GO y 3,4-DHS. Se registraron los espectros de disoluciones conteniendo GO y concentraciones crecientes de 3,4-DHS, tanto de absorción como de emisión, tras 24 horas para permitir la interacción entre el nanomaterial y el ligando.



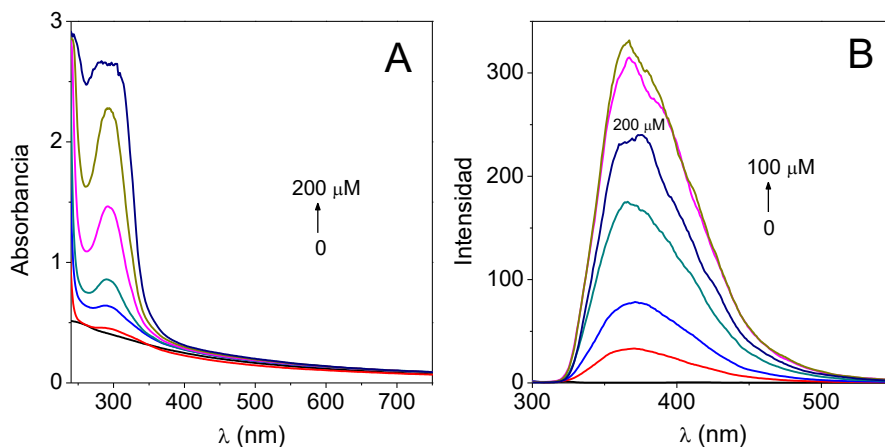


Fig. 2.3. Espectros de absorción (A) y emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ) (B) de disoluciones que contienen GO  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  y 3,4-DHS entre 5 y  $200 \mu\text{M}$  en tampón fosfato  $0.1 \text{ M}$  pH 7.0.

En el espectro de absorción (figura 2.3A) se puede observar un aumento en la banda de absorción del 3,4-DHS a  $290 \text{ nm}$  a medida que aumenta la concentración de este. No se observa desplazamiento en la banda de absorción del 3,4-DHS por la presencia del GO, lo que parece indicar que la interacción entre el nanomaterial y las moléculas de 3,4-DHS es pequeña. Esto se puede explicar por la presencia de grupos funcionales en la superficie de GO, lo que hace que no abunden las regiones formadas por carbonos  $\text{sp}^2$  sobre las que se pueda adsorber el 3,4-DHS.

En el espectro de emisión (figura 2.3B) se observa la banda característica a  $370 \text{ nm}$  del 3,4-DHS, que aumenta en intensidad con la concentración de 3,4-DHS hasta alcanzar un valor máximo a  $100 \mu\text{M}$  y luego disminuye por la gran cantidad de moléculas presentes, que chocan entre sí, de manera que pierden energía, en lo que se conoce como amortiguación dinámica.

## 2.2 Reducción de óxido de grafeno con 3,4-DHS

La baja conductividad del GO supone un inconveniente para su utilización en la nanoestructuración de electrodos, ya que puede impedir la transferencia electrónica. Sin embargo, la reparación del sistema  $\pi$ -conjugado mediante la reducción del GO, da lugar a la recuperación de su conductividad. De esta manera, el material resultante

presenta unas propiedades adecuadas para su uso en el desarrollo de plataformas electrocatalíticas. Además, la reducción de GO para formar grafeno reducido (rGO) genera láminas con una proporción significativamente menor de grupos oxigenados, lo que provoca un aumento, tanto en el tamaño como en la cantidad, de regiones  $sp^2$  disponibles para la funcionalización no covalente.

En la literatura, se encuentran ejemplos de reducción de GO mediante el uso de agentes reductores como la hidrazina [Stankovich, 2007] o el borohidruro sódico ( $NaBH_4$ ) [Shin, 2009], entre otros. Es interesante destacar que también ha sido descrita la reducción de GO utilizando hidroquinona como reductor. En el trabajo de Wang [Wang, 2008a], la reducción se lleva a cabo mediante calentamiento a reflujo de una mezcla acuosa de GO e hidroquinona.

La presencia de grupos hidroquinona en la estructura del 3,4-DHS (figura 2.4) lo convierte en un potencial agente reductor para el GO. Además, como se ha visto en el capítulo anterior para los nanotubos de carbono, el 3,4-DHS puede adsorberse sobre la superficie formada por carbonos  $sp^2$ . Por este motivo se evaluó la posibilidad de utilizar el 3,4-DHS como reductor, a la vez que modificador, en la reducción de GO, según el esquema de la figura 2.4.

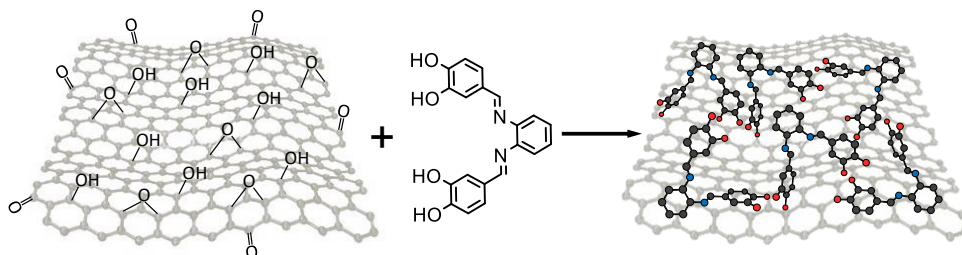


Fig. 2.4. Esquema de la reducción de GO con 3,4-DHS.

### 2.2.1 Efecto de la concentración de 3,4-DHS en la reducción de óxido de grafeno

Con la idea de potenciar el efecto reductor de 3,4-DHS, de acuerdo con los datos de la bibliografía [Wang, 2008a], las disoluciones del apartado anterior (2.1), que contenían GO y 3,4-DHS en diferentes concentraciones, se calentaron a 100 °C

durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se registraron los espectros de absorción y emisión que se muestran en la figura 2.5.

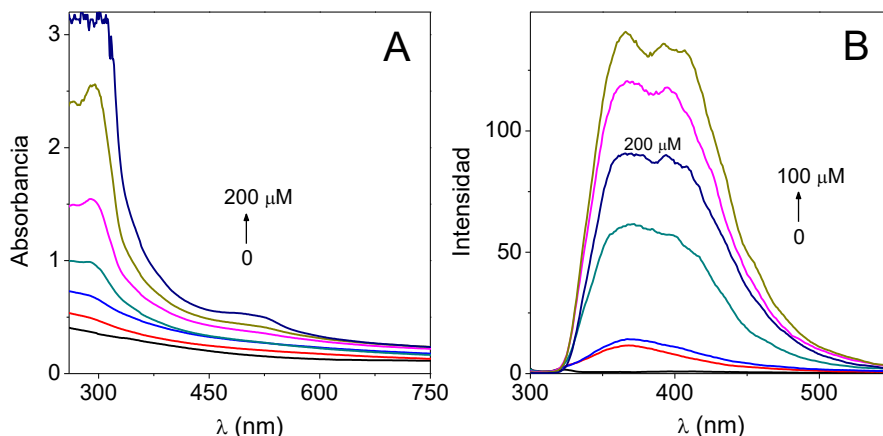


Fig. 2.5. Espectros de absorción (A) y emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm) (B) de disoluciones que contienen GO 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 3,4-DHS entre 0 y 0.2 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 después de calentar durante 1 hora.

En el espectro de absorción (figura 2.5A), se observa la aparición de una nueva banda alrededor de 530 nm, que se puede asociar a las transiciones  $n-\pi^*$  del puente fenileno formado a través de los nitrógenos sobre la superficie del grafeno [Abad, 2011].

En el espectro de emisión (figura 2.5B), aparecen la banda a 370 nm, que ya aparecía en el espectro de la disolución antes de calentar, y una nueva banda a 417 nm. La banda a 370 nm se asocia a la forma reducida de 3,4-DHS, mientras que la banda a 417 nm se puede asociar a la forma oxidada de 3,4-DHS, formada al reducir al GO. Se observa, además, que la banda de 3,4-DHS a 370 nm disminuye, provocado por la presencia de grafeno reducido, que, al ser más insoluble, produce una amortiguación dinámica.

La mayor intensidad de fluorescencia se observa para la concentración de 3,4-DHS de 0.1 mM, por lo que se eligió esta concentración para continuar los estudios.

### 2.2.2 Efecto del tiempo de reacción en la reducción de óxido de grafeno con 3,4-DHS

Ya que el calentamiento durante 1 hora produce cambios en el óxido de grafeno, para determinar el tiempo óptimo de reacción, se estudió la influencia del tiempo de calentamiento, entre 1 y 9 horas.

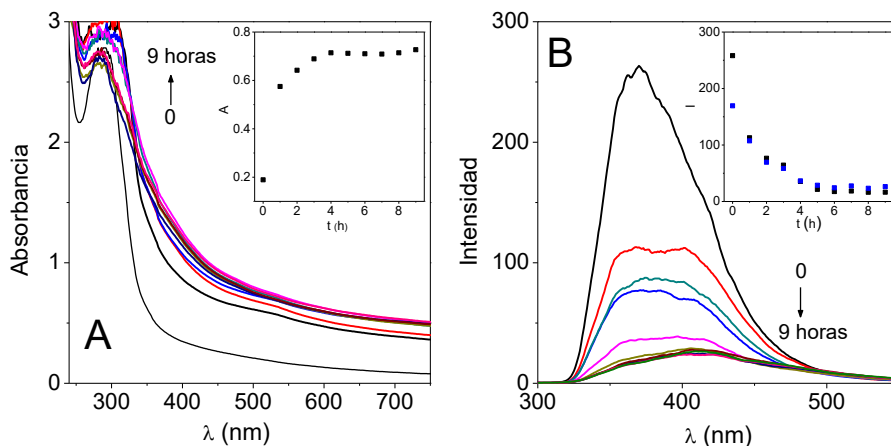


Fig. 2.6. (A) Espectros de absorción e inserto: absorción a 530 nm y (B) espectros de emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm) e inserto: emisión a 370 nm (—) y a 417 nm (—) de disoluciones que contienen GO  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  y 3,4-DHS  $0.1 \text{ mM}$  en tampón fosfato  $0.1 \text{ M}$  pH 7.0 antes y después de calentar durante entre 1 y 9 horas.

En los espectros de absorción (figura 2.6A) se puede apreciar que la banda a 530 nm, asociada al puente fenileno, va desapareciendo con el tiempo, probablemente, debido a que, según se va reduciendo el grafeno, las regiones  $\text{sp}^2$  disponibles aumentan en tamaño y número y se favorece la interacción entre el grafeno reducido y el 3,4-DHS mediante apilamiento  $\pi$ - $\pi$ . En la representación de la absorbancia a 530 nm frente al tiempo de reacción (figura 2.6A inserto) se alcanza un máximo a las 4 horas de reacción, que se mantiene para tiempos superiores.

En los espectros de emisión (figura 2.6B) se observa que tanto la banda asociada a la forma reducida (370 nm) como a la oxidada (417 nm) del 3,4-DHS disminuyen con el tiempo, alcanzando un mínimo a las 5 horas y manteniéndose para tiempos de reacción más largos.

Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió 5 horas como el tiempo óptimo de reacción.

## 2.3 Caracterización del material sintetizado

Tras el tratamiento térmico, la suspensión de grafeno y 3,4-DHS pasa de un color marrón a un precipitado negro. Esto se debe probablemente a un aumento en la hidrofobicidad del material causado por una disminución en los grupos funcionales polares de la superficie de las láminas de grafeno [Stankovich, 2007]. Este cambio en las propiedades del material, apreciables a simple vista, hace pensar que la reducción de GO a grafeno reducido con 3,4-DHS para formar el material híbrido (rGO-DHS) ha sido exitosa.

### 2.3.1 Caracterización de rGO-DHS mediante espectrofotometría de absorción y emisión

El material sintetizado se caracterizó mediante espectrofotometría de absorción UV-visible y de emisión de fluorescencia en disolución. En la figura 2.7 se muestran los espectros del rGO-DHS (—) y de la mezcla de GO y 3,4-DHS antes de ser sometida al tratamiento térmico de reducción (—).

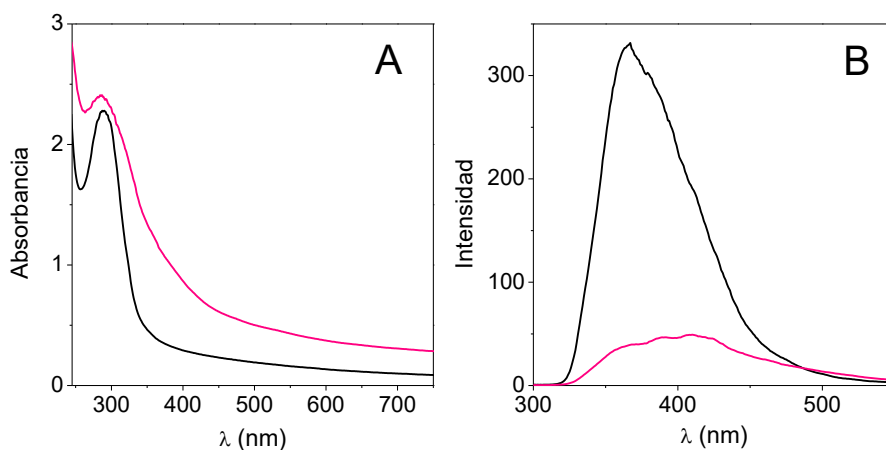


Fig. 2.7. Espectros de absorción (A) y emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ) (B) de rGO-DHS (—) y de una disolución que contiene GO  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  y 3,4-DHS  $0.1 \text{ mM}$  (—) en tampón fosfato  $0.1 \text{ M}$  pH 7.0.

En el espectro de absorción (figura 2.7A) no se observa desplazamiento en la banda a  $290 \text{ nm}$  en el rGO-DHS con respecto a la mezcla de los precursores, aunque se

vuelve más ancha, debido a la interacción  $\pi$ - $\pi$  entre el grafeno y el 3,4-DHS. Además, se aprecia una mayor dispersión de la luz, seguramente debido a la menor solubilidad del rGO-DHS con respecto al GO.

En el espectro de emisión (figura 2.7B) se observa una amortiguación de la fluorescencia del rGO-DHS, que puede ser debida a la presencia de la forma más insoluble del grafeno, que provoca una amortiguación dinámica. Además, se hace predominante la segunda banda a 417 nm, que está relacionada con la forma oxidada del 3,4-DHS, lo que concuerda con lo esperado tras la reducción del GO.

El objetivo perseguido al utilizar 3,4-DHS como agente reductor del GO es que el ligando se quede adsorbido sobre la superficie del grafeno reducido obteniendo grafeno modificado químicamente, que combina las propiedades de ambas sustancias. Para comprobar que esta interacción es lo suficientemente fuerte y la modificación es estable, una vez reducido, el rGO-DHS se centrifugó y se lavó con agua para eliminar todo el 3,4-DHS libre. Tras su resuspensión en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0 se registraron los espectros de absorción y emisión.

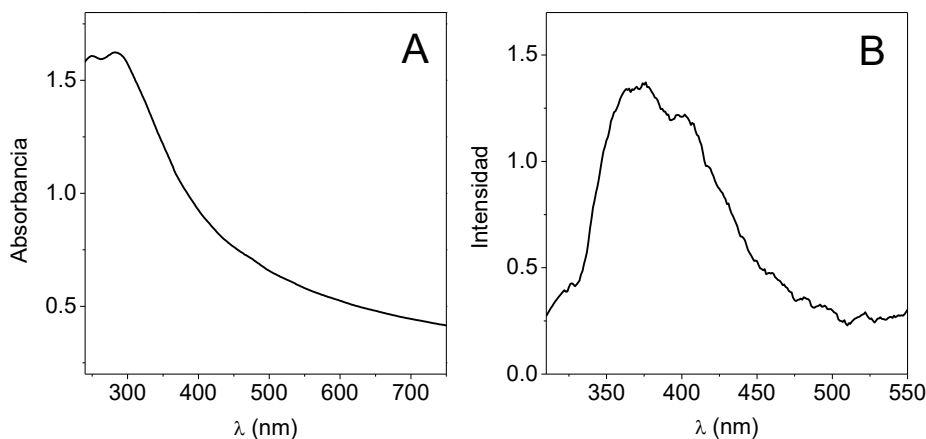


Fig. 2.8. Espectros de absorción (A) y emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm) (B) de rGO-DHS tras centrifugación y resuspensión en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

Como se puede observar, el espectro de absorción (figura 2.8A) presenta una forma similar al obtenido antes de la centrifugación. En él aparece la banda a 290 nm del 3,4-DHS.

En el espectro de emisión (figura 2.8B) aparecen las dos bandas a 370 y 417 nm de 3,4-DHS, sin embargo, la intensidad de emisión disminuye con respecto a la que presentaba antes de centrifugar, debido a la menor cantidad de 3,4-DHS presente.

De los resultados obtenidos se puede deducir que la composición cualitativa es la misma que antes de la centrifugación, ya que aparecen las bandas asociadas al 3,4-DHS. Se puede concluir que el 3,4-DHS se encuentra fuertemente adsorbido sobre la superficie del grafeno, de manera que este queda químicamente modificado, formando el material híbrido rGO-DHS.

### **2.3.2 Caracterización de rGO-DHS mediante espectroscopía Raman**

Una de las técnicas más empleadas en la caracterización del grafeno es la espectroscopía Raman. Esta técnica se basa en la dispersión inelástica de una luz monocromática y ofrece información sobre los modos vibracionales y rotacionales del material.

El espectro Raman de los materiales carbonáceos presenta dos bandas relativamente intensas asociadas a los carbonos  $sp^2$ , las bandas D y G. La banda G aparece siempre en la región  $1500-1630\text{ cm}^{-1}$  y está asociada con la vibración de los carbonos  $sp^2$ , tanto de los anillos como de las cadenas. La banda D suele aparecer alrededor de  $1355\text{ cm}^{-1}$  y se asocia con la vibración fuera del plano de los carbonos  $sp^2$  de los anillos aromáticos. Este modo vibracional está prohibido en el grafito y se vuelve activo en presencia de defectos estructurales [Ferrari, 2000]. Otras bandas menos intensas presentes en los espectros Raman de los materiales de carbono amorfo son la banda D', también asociada a la presencia de defectos, y los sobretonos 2D, D+G y 2G.

La relación de las intensidades de las bandas D y G ( $I_D/I_G$ ) se usa como un indicador del grado de desorden. En un primer momento, Tuinstra y Koenig establecieron que, en el caso del grafito nanocristalino, la relación  $I_D/I_G$  era inversamente proporcional al tamaño de las regiones  $sp^2$  [Tuinstra, 1970]. Años más tarde, Ferrari y Robertson [Ferrari, 2000] expusieron que, cuando la densidad de defectos es alta y, por tanto, el tamaño de los dominios cristalinos es pequeño, la fuerza del modo D es proporcional a la probabilidad de encontrar un anillo hexagonal en esa región, es decir, al tamaño

de la región. Así, para carbonos amorfos, como es el caso tanto del GO como del grafeno reducido (rGO), un aumento en la relación  $I_D/I_G$  indica un mayor grado de orden.

En la figura 2.9 se muestran los espectros Raman de rGO-DHS y GO. Como se puede ver, el rGO-DHS (2.9A) presenta dos bandas intensas centradas en  $1348$  y  $1591\text{ cm}^{-1}$ , las bandas D y G, así como otras menos intensas, la banda D', centrada en  $1603\text{ cm}^{-1}$  y los sobretonos 2D, D+G y 2G en la región  $2500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ . Para el ajuste de las curvas se han usado funciones Lorentzianas, excepto en el caso de la banda G, para la que se ha usado una función Breit–Wigner–Fano (BWF) [Ferrari, 2000]. La posición de las bandas se muestra en la tabla 2.1. Al comparar con el GO (figura 2.9B) se puede apreciar la diferencia en la relación  $I_D/I_G$ . En el caso del GO, esta relación es de  $0.90 \pm 0.03$ , mientras que para rGO-DHS es de  $1.07 \pm 0.02$ , siendo ambos valores la media de diez espectros. Estos valores indican que el rGO-DHS es un material más ordenado, con regiones  $\text{sp}^2$  de mayor tamaño que el GO.

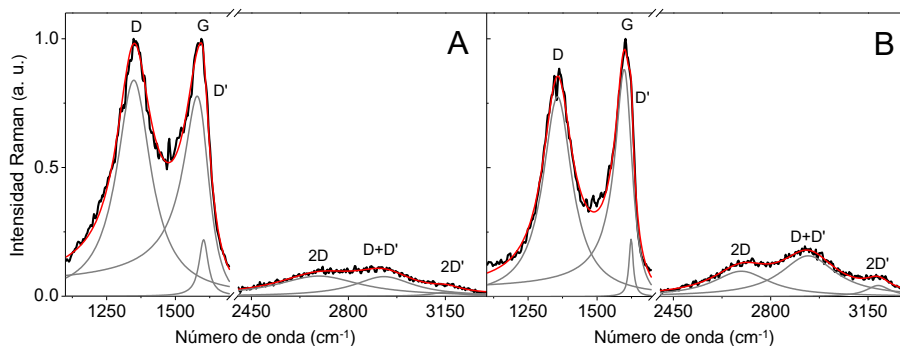


Fig. 2.9. Espectro Raman de (A) rGO-DHS y (B) GO. La línea roja corresponde al ajuste y las líneas grises a los diferentes componentes del ajuste. Láser de excitación de 488 nm.

A modo de comparación se registraron los espectros Raman de grafeno reducido con otros reductores empleados comúnmente, como son el  $\text{NaBH}_4$  [Shin, 2009] y la hidrazina [Stankovich, 2007], según el procedimiento recogido en la sección de materiales y métodos.



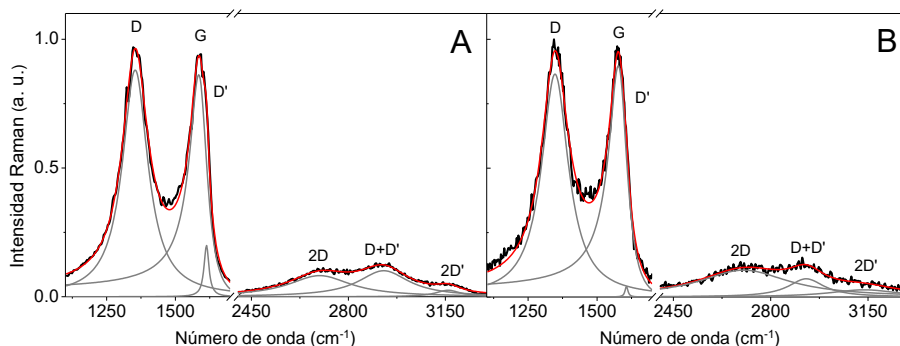


Fig. 2.10. Espectro Raman de (A) rGO con  $\text{NaBH}_4$  y (B) rGO con hidrazina. La línea roja corresponde al ajuste y las líneas grises a los diferentes componentes del ajuste. Láser de excitación de 488 nm.

En ambos espectros (figura 2.10) se observa la misma tendencia que en la reducción con 3,4-DHS, un aumento en la relación  $I_D/I_G$ , como se puede comprobar en los valores recogidos en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Desplazamiento Raman de las bandas para GO y rGO con 3,4-DHS,  $\text{NaBH}_4$  e hidrazina, expresado en  $\text{cm}^{-1}$ . Los parámetros de medida son: potencia de láser de  $70 \mu\text{W}$ , tiempo de integración de 0.5 s y objetivo 100x.

banda	GO	rGO-DHS	rGO $\text{NaBH}_4$	rGO hidrazina
D	1356	1348	1352	1348
G	1604	1591	1594	1583
D'	1623	1603	1610	1606
2D	2694	2693	2697	2703
D+D'	2934	2928	2936	2928
2D'	3186	3154	3163	3136
$I_D/I_G$	$0.90 \pm 0.03$	$1.07 \pm 0.02$	$1.04 \pm 0.02$	$1.04 \pm 0.01$

Estos resultados permiten afirmar que el GO ha sido efectivamente reducido y que el 3,4-DHS es un buen reductor en la síntesis de rGO, comparable con otros reductores conocidos, como la hidrazina o el  $\text{NaBH}_4$ .

## 2.4 Desarrollo de electrodos modificados con rGO-DHS

La modificación química del grafeno con 3,4-DHS permite obtener un material híbrido que combine las propiedades de ambos componentes, que pueden tener diferentes aplicaciones. Por otro lado, en la bibliografía se encuentran diferentes ejemplos del uso de grafeno reducido en el desarrollo de sensores electroquímicos, dado que este presenta una mejor conducción. Por ejemplo, el trabajo de Takahashi [Takahashi, 2013] en el que se describe la detección de hidrazina y peróxido de hidrógeno utilizando un electrodo de carbón vítreo sobre el que se ha electrorreducido GO, o el de Liu [Liu, 2016], que describe un sensor de hidrazina utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro y platino sobre grafeno. En otros trabajos, además del grafeno reducido, se utilizan moléculas electroactivas para dotar al electrodo de propiedades específicas, por ejemplo, electrocatálisis. Algunos ejemplos son los trabajos de Ameen [Ameen, 2012], donde se utiliza un electrodo de óxido de estaño fluorado modificado con grafeno reducido y polianilina para determinación de hidrazina o el de Wang [Wang, 2010], en el que se describe el uso de un electrodo de carbón vítreo modificado con grafeno reducido y poliestireno sulfonato para la determinación de hidrazina.

El 3,4-DHS presenta propiedades electrocatalíticas frente a la oxidación de NADH e hidrazina debido a la presencia de grupos *o*-quinona en su estructura [Revenga-Parra, 2005; Bravo, 2015]. El material híbrido sintetizado, rGO-DHS, se espera que presente las propiedades de ambos precursores. Por este motivo, se estudió el comportamiento electroquímico de electrodos serigrafados de carbono nanoestructurados con rGO-DHS (CSPEs/rGO-DHS) y su potencial aplicación como plataformas electrocatalíticas hacia moléculas de interés.

### 2.4.1 Caracterización de los electrodos nanoestructurados con rGO-DHS mediante voltamperometría cíclica

En la figura 2.11 se muestra el voltamperograma de un CSPE nanoestructurado con rGO-DHS (—). Se puede observar en él un par redox con picos anódico y catódico centrados en +0.22 y +0.08 V, respectivamente. Este par se adscribe al sistema

quinona/hidroquinona presente en el 3,4-DHS, confirmando de nuevo que el 3,4-DHS se encuentra sobre la superficie del grafeno. La separación de picos ( $\Delta E_p$ ) de 0.145 V está lejos de ser cero, que es el valor predicho por la teoría que explica el comportamiento de especies adsorbidas en la superficie del electrodo [Bard, 2001], lo que sugiere que existen limitaciones en la transferencia de carga.

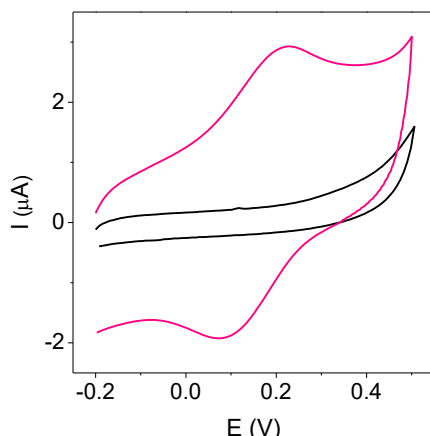


Fig. 2.11. Voltamperogramas cíclicos de CSPEs nanoestructurado con rGO-DHS (—) y con una mezcla de GO y 3,4-DHS sometida al tratamiento de centrifugación (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

A modo de comparación, una mezcla de GO y 3,4-DHS no sometida al tratamiento térmico, es decir, que no se ha producido la reducción del GO, se centrifugó al igual que se hizo con el rGO-DHS y se depositó sobre el electrodo. En el voltamperograma correspondiente (—) no se observa el par redox del 3,4-DHS. Esto es debido a que apenas se produce la adsorción de 3,4-DHS sobre el GO por el reducido tamaño de las regiones formadas por carbonos  $\text{sp}^2$ .

#### 2.4.1.1 Efecto del pH

La respuesta voltamperométrica del rGO-DHS se debe a los grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHS, por lo que se espera que sea dependiente del pH. Por este motivo, se estudió el efecto del pH en la respuesta de los electrodos nanoestructurados con rGO-DHS mediante voltamperometría cíclica.

En los voltamperogramas de la figura 2.12A se puede observar que los potenciales de pico, tanto anódico como catódico, se van desplazando hacia valores más negativos al aumentar el pH de la disolución.

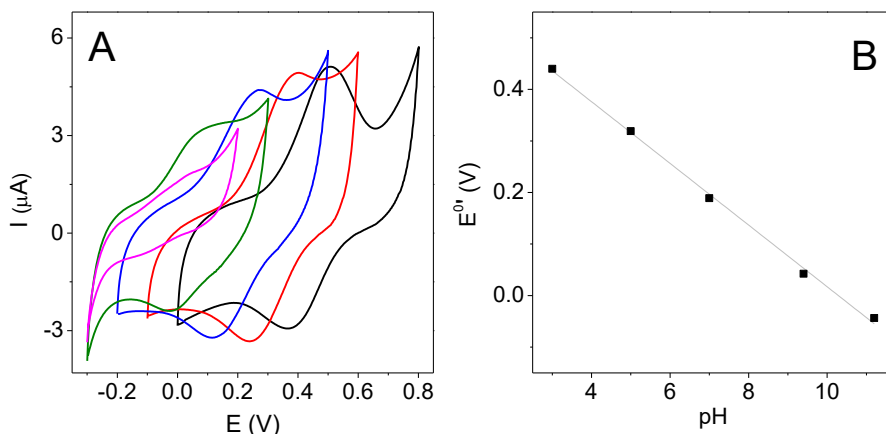
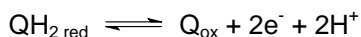


Fig. 2.12. (A) Voltamperogramas cíclicos de CSPEs/rGO-DHS a diferentes a diferentes valores de pH: 3.0 (—), 5.0 (—), 7.0 (—), 9.0 (—) y 11.2 (—) a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Potenciales formales en función del pH.

El potencial formal del par redox ( $E^{0'}$ ) se desplaza hacia potenciales más negativos de forma lineal en función del pH, con una pendiente de  $-59.9 \text{ mV/unidad de pH}$  (figura 2.12B). Este valor es el esperado para sistemas que intercambian el mismo número de protones que de electrones. Teniendo en cuenta esto, el proceso redox para cada grupo quinona/hidroquinona se puede representar como:



El proceso global para 4 electrones y 4 protones está representado en la figura 1.17 del capítulo 1.

#### 2.4.1.2 Efecto de la velocidad de barrido

En la figura 2.13 se muestran los voltamperogramas cíclicos de CSPEs nanoestructurados con rGO-DHS en tampón fosfato  $0.1 \text{ M}$  pH 7.0 a velocidades de barrido inferiores a  $0.6 \text{ V s}^{-1}$ . En el inserto de esa figura se puede observar que, para estas velocidades, las corrientes de pico anódica y catódica siguen una relación lineal

con la velocidad de barrido, lo que es característico de materiales redox confinados en la superficie del electrodo.

Además, el potencial formal del sistema se mantiene más o menos constante para velocidades de barrido bajas, lo que indica una cinética rápida de transferencia de carga. La separación entre los potenciales de pico de 0.1 V sugiere un comportamiento electroquímico cuasi-reversible.

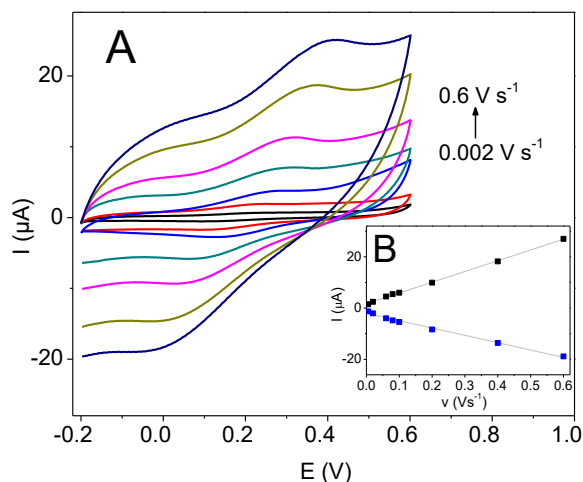


Fig. 2.13. (A) Voltamperogramas cíclicos de CSPE/rGO-DHS a pH 7.0 a diferentes velocidades de barrido. (B) Variación de la intensidad de corriente anódica (—) y catódica (—) con la velocidad de barrido.

Se empleó el método de Laviron [Laviron, 1979] para determinar la constante de velocidad de transferencia de carga ( $k_s$ ) y el coeficiente de transferencia ( $\alpha$ ) a partir de la variación de los potenciales de pico anódico y catódico obtenidos para diferentes velocidades de barrido. En la figura 2.14A se representan estos potenciales frente al logaritmo de la velocidad de barrido. Para velocidades superiores a  $0.8 \text{ V s}^{-1}$  los valores de los potenciales de pico siguen una relación lineal con el logaritmo de la velocidad de barrido, como puede observarse en la figura 2.14B. A partir de estos resultados se han obtenido los valores de  $8.92 \text{ s}^{-1}$  para  $k_s$  y de 0.51 para  $\alpha$ . Se ha considerado que cada molécula intercambia cuatro electrones, dos por cada grupo funcional quinona/hidroquinona.

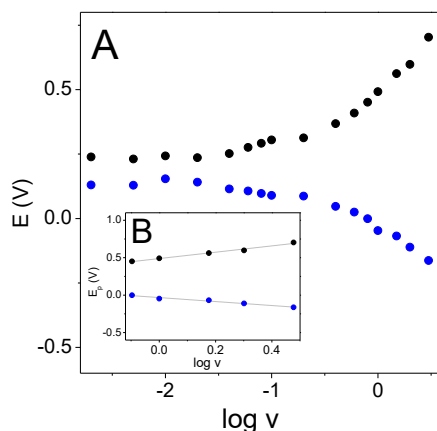


Fig. 2.14. (A) Variación del potencial de pico anódico (●) y catódico (●) con el logaritmo de la velocidad de barrido para CSPE/rGO-DHS modificados con 3,4-DHS a pH 7.0 a diferentes velocidades de barrido. (B) Ampliación de la gráfica anterior para velocidades de barrido superiores a  $0.8 \text{ V s}^{-1}$ .

La  $k_s$  obtenida es mucho menor que la observada para el 3,4-DHS adsorbido sobre electrodos de carbón vítreo,  $270 \text{ s}^{-1}$  [Revenga-Parra, 2005]. Esto puede deberse a que el 3,4-DHS no se encuentra directamente adsorbido sobre la superficie del electrodo, sino sobre el grafeno, que, a su vez, está adsorbido sobre la superficie del electrodo, lo que puede ralentizar la transferencia de carga. El valor de  $\alpha$  cercano a 0.5 es el esperado para una reacción reversible, donde los procesos de oxidación y reducción son muy similares energéticamente [Bard, 2001].

## 2.4.2 Caracterización de los electrodos modificados con grafeno mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es un método eficaz para la caracterización de electrodos modificados, mediante la cual se puede estudiar la conductividad de un electrodo modificado a partir de la medida de la corriente obtenida como respuesta cuando se aplican pequeñas perturbaciones del potencial a una cierta frecuencia impuesta. La impedancia es una resistencia y se define como el cociente entre el potencial aplicado y la intensidad medida [Macdonald, 2005].

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_m \cdot \sin(\omega t)}{I_m \cdot \sin(\omega t + \phi)}$$

donde  $Z(\omega)$  es la impedancia electroquímica del sistema,  $\omega$  es la frecuencia y  $\Phi$  es el desfase entre la corriente medida y el potencial aplicado. Habitualmente, la impedancia se expresa como un número complejo, la parte real se representa como  $Z'$  y la parte imaginaria, como  $Z''$ .

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + jZ''(\omega)$$

El diagrama de Nyquist es la representación gráfica más común de los datos de espectroscopía de impedancia. En él se representa la impedancia imaginaria ( $Z''$ ) frente a la impedancia real ( $Z'$ ).

Es un hecho conocido que el grafeno reducido es mejor conductor de la corriente eléctrica que el óxido de grafeno [Stankovich, 2007]. Los resultados obtenidos en experimentos de espectroscopía de impedancia electroquímica con electrodos modificados con GO y con grafeno reducido ponen de manifiesto que existe una diferencia en la respuesta de ambos materiales [Casero, 2012; Stergiou, 2010]. Concretamente, se observa una diferencia en la resistencia a la transferencia de carga, es decir, en la conductividad de los electrodos modificados. Esto hace posible distinguir entre ambos tipos de grafeno. Por este motivo, se utilizó la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica para estudiar el comportamiento de electrodos modificados con rGO-DHS y, a modo de comparación, con GO, en una disolución 10 mM de  $K_3[Fe(CN)_6]$  y  $K_4[Fe(CN)_6]$  en KCl 0.1 M.

La figura 2.15 muestra los diagramas de Nyquist para los CSPE nanoestructurados con rGO-DHS (—) o con GO (—). Se pueden apreciar dos intervalos de frecuencia, que corresponden a un control cinético y a un control difusional. A altas frecuencias se observan los semicírculos que corresponden al proceso de resistencia a la transferencia de carga a través de la interfase entre el electrolito y el nanomaterial ( $R_{CT}$ ), cuyo valor se puede obtener a partir de la diferencia entre los dos puntos de corte de la curva con el eje. De la intersección de la curva con el eje a altas frecuencias se puede obtener el valor de la resistencia de la disolución ( $R_s$ ). La doble capa eléctrica formada en la interfase entre el electrodo y la disolución se comporta como un condensador (C) y el valor de su capacitancia se puede calcular a partir de

la frecuencia en el máximo de la curva. La parte lineal observada a frecuencias bajas se relaciona con un proceso difusional.

Un sistema electroquímico real se puede considerar como una combinación de procesos y cada uno de ellos se puede representar como un componente electrónico en un circuito equivalente. Los datos experimentales se ajustaron a los circuitos equivalentes mostrados en la figura 2.15, que incluyen, además de  $R_s$  y  $R_{CT}$ , un elemento de impedancia de Warburg ( $W$ ), que representa la difusión de la sonda redox hacia el electrodo, y un elemento de fase constante ( $CPE$ ), que simula el comportamiento no ideal de un condensador y combina la capacitancia consecuencia de la modificación de la superficie y de la doble capa. De esta manera, se tiene en cuenta la falta de homogeneidad en la superficie. En el ajuste de este elemento se obtiene un coeficiente de idealidad ( $n$ ), cuyo valor indica la proximidad del sistema real a uno ideal, la superficie es más homogénea cuanto más cercano a la unidad sea el valor de  $n$ .

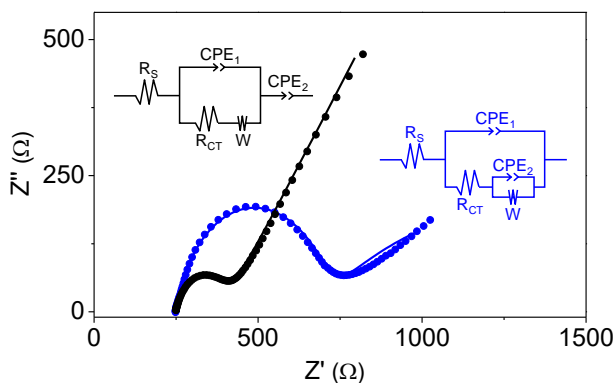



Fig. 2.15. Diagramas de Nyquist de CSPE nanoestructurado con rGO-DHS (—) y con GO (—) en KCl 0.1 M conteniendo  $K_3[Fe(CN)_6]$  10 mM y  $K_4[Fe(CN)_6]$  10 mM y circuitos equivalentes. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos experimentales.

En el caso de los electrodos modificados con rGO-DHS,  $R_{CT}$  y  $CPE_1$  corresponden a la interfase entre la disolución y el electrodo nanoestructurado con grafeno reducido y  $W$  corresponde a la difusión de la sonda a través del grafeno reducido modificado con el 3,4-DHS. Además, en el ajuste es necesaria la introducción de un segundo



elemento de fase constante,  $CPE_2$ , que indica la presencia de una segunda capa, en este caso, el 3,4-DHS que modifica al rGO [Metikoš-Huković, 2003].

En el caso del electrodo modificado con GO, el circuito equivalente (figura 2.15 ) representa una superficie de grafeno parcialmente cubierta por grupos oxigenados. En este caso,  $R_{CT}$  y  $CPE_1$  corresponden a la superficie del grafeno libre de esos grupos oxigenados y  $CPE_2$  y  $W$  corresponden a las zonas de la superficie donde se encuentran los ácidos carboxílicos, alcoholes, carbonilos... [Casero, 2012].

Tanto los datos experimentales obtenidos gráficamente a partir de los diagramas de Nyquist como los obtenidos a partir del ajuste para rGO-DHS y GO se recogen en la tabla 2.2. Se puede observar que el valor de la resistencia a la transferencia de carga es mucho menor en el caso del rGO-DHS, lo que demuestra, como se esperaba, que el rGO-DHS es un material más conductor que el GO. El valor de  $CPE_1$  es del mismo orden de magnitud tanto para el rGO-DHS como para el GO y el coeficiente de idealidad es también similar y cercano a uno, como cabría esperar, ya que se relaciona en ambos casos con la superficie homogénea del grafeno libre de grupos oxigenados. Sin embargo, en el caso de  $CPE_2$ , el valor para GO es más elevado, con un coeficiente de idealidad muy alejado de la unidad, lo que se corresponde con una superficie muy heterogénea.

Tabla 2.2. Resultados experimentales y de los ajustes de los experimentos de EIS.

	<b>rGO-DHS</b>	<b>GO</b>
<b>resultados experimentales</b>		
$R_s$ ( $\Omega$ )	249	253
$R_{CT}$ ( $\Omega$ )	192	478
$C$ (F)	$9.7 \times 10^{-7}$	$1.3 \times 10^{-6}$
<b>resultados de los ajustes</b>		
$R_s$ ( $\Omega$ )	249.9	255.6
$R_{CT}$ ( $\Omega$ )	144.1	455
$CPE_1$ (S sn)	$0.53 \times 10^{-5}$	$0.14 \times 10^{-5}$
$n_1$	0.85	0.87
$W$ ( $\Omega$ )	$0.27 \times 10^{-2}$	$0.11 \times 10^{-2}$
$CPE_2$ (S sn)	$0.72 \times 10^{-3}$	$0.15 \times 10^{-2}$
$n_2$	0.55	0.11

La resistencia de Warburg es similar en ambos casos debido a la presencia de los grupos oxigenados, que, en el caso del GO pertenecen al propio grafeno y, en el caso del rGO-DHS pertenecen al 3,4-DHS.

De estos resultados se puede concluir que existen diferencias electroquímicas entre el electrodo nanoestructurado con GO o con rGO-DHS, en concreto, el electrodo modificado con rGO-DHS presenta una menor resistencia a la transferencia de carga y es, por tanto, más conductor.

## **2.5 Aplicaciones analíticas de los electrodos modificados desarrollados**

### **2.5.1 Oxidación electrocatalítica de hidrazina**

En el capítulo 1 ya se ha comentado la importancia de la molécula de hidrazina como analito, así como de la relevancia del desarrollo de electrodos modificados que reduzcan el potencial al que se lleva a cabo su determinación. Existen varios ejemplos del uso de grafeno reducido [Takahashi, 2013; Liu, 2016; Ameen, 2012; Wang, 2010], y también de 3,4-DHS [Revenga-Parra, 2005; Bravo, 2015] para lograr la oxidación de hidrazina, con reducción del potencial de hasta 500 mV. Teniendo en cuenta que el nuevo material sintetizado, rGO-DHS, está formado por ambos componentes, se estudiaron las propiedades electrocatalíticas de rGO-DHS frente a la oxidación de hidrazina.

En la figura 2.16 se muestran los voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados en ausencia y en presencia de hidrazina 1.0 mM. En ausencia de hidrazina se observan el par redox característico del 3,4-DHS. En presencia de hidrazina, la corriente de pico anódica a 0.22 V se incrementa drásticamente, mientras que la catódica disminuye, lo que indica que se trata de un proceso de oxidación catalítico.

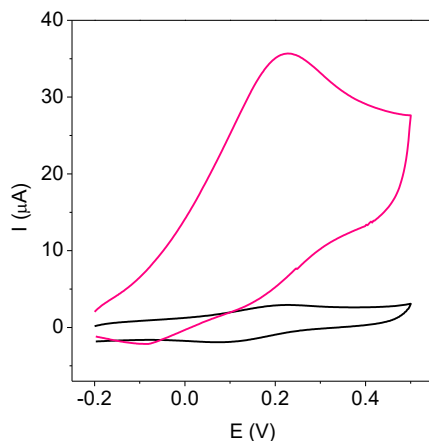


Fig. 2.16. Voltamperogramas cíclicos de CSPE/rGO-DHS en ausencia (—) y en presencia (—) de hidrazina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Tanto el aumento de intensidad de corriente como la disminución del potencial de oxidación son considerables si se comparan con los datos obtenidos al realizar la oxidación de hidrazina en un electrodo sin modificar. Como se observa en la figura 2.17A, esta se produce a un potencial superior a 0.5 V. Lo mismo sucede cuando el electrodo se modifica con GO (figura 2.17B), donde no se observa ningún pico de oxidación en la ventana de potencial estudiada. En el caso del CSPE modificado directamente con 3,4-DHS se observa un pico de oxidación catalítico a 0.26 V, pero con mucha menor intensidad de corriente.

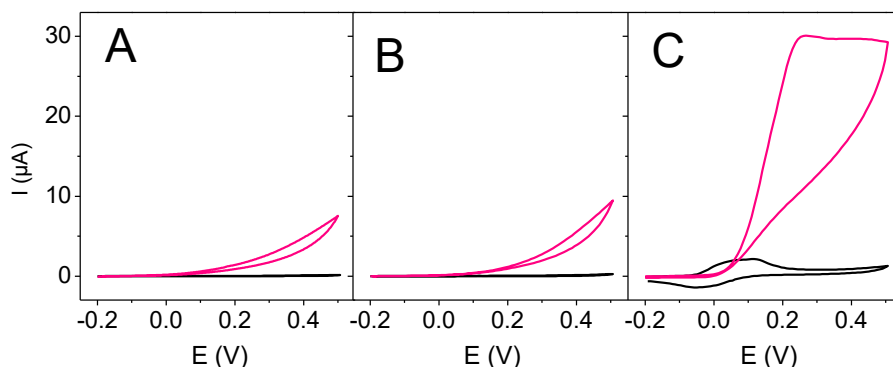


Fig. 2.17. Voltamperogramas cíclicos de CSPE no modificado (A), CSPE modificado con GO (B) y con 3,4-DHS (C) en ausencia (—) y en presencia (—) de hidrazina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

La presencia del nanomaterial disminuye el potencial de oxidación de la hidrazina, además de aumentar la corriente catalítica. Esto resulta más evidente al comparar la eficiencia catalítica, mucho mayor en el caso del CSPE nanoestructurado con rGO-DHS (tabla 2.3) que cuando este se modifica directamente con 3,4-DHS. Este efecto se debe en parte al aumento del área específica que causa la nanoestructuración y a la mejora en la transferencia de carga por parte del grafeno reducido.

Tabla 2.3. Potenciales de pico de oxidación de hidrazina y eficiencia catalítica para CSPEs modificados en presencia de hidrazina 1 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

	$E_{pa} \text{ (V)}$	eficiencia catalítica
no modificado	> 0.5	-
GO	> 0.5	-
3,4-DHS	0.26	6.8
rGO-DHS	0.22	12.6

Estos resultados confirman que los CSPEs nanoestructurados con rGO-DHS son buenas plataformas electrocatalíticas para la oxidación de hidrazina. Con el fin de utilizar estas plataformas nanoestructuradas como sensores de hidrazina, se estudió el efecto del pH y de la velocidad de barrido en el proceso electrocatalítico.

#### 2.5.1.1 Efecto del pH en la oxidación electrocatalítica de hidrazina

En las reacciones de oxidación, tanto de hidrazina como de 3,4-DHS, hay protones implicados. Por este motivo, es importante estudiar la influencia del pH del medio en la respuesta electrocatalítica.

En la figura 2.18A se muestran los voltamperogramas de CSPEs nanoestructurados con rGO-DHS en presencia de hidrazina 1.0 mM a diferentes valores de pH entre 3.0 y 11.2. Se puede observar cómo a medida que aumenta el pH el potencial de pico catalítico se desplaza hacia valores más negativos, debido a la implicación de los protones en la reacción. Este desplazamiento es lineal con respecto al pH

(figura 2.18B), con una pendiente de 69 mV, cercana al valor que corresponde a un proceso en el que se intercambia el mismo número de protones que de electrones.

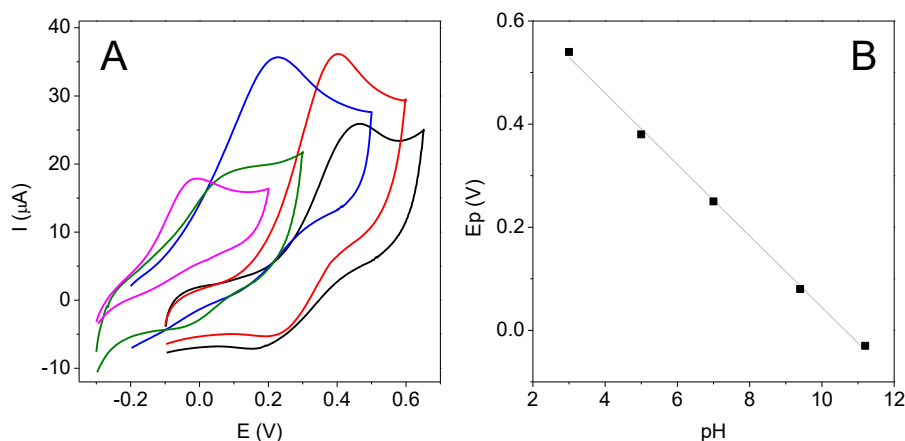


Fig. 2.18. (A) Voltamperogramas cíclicos de CSPEs/rGO-DHS en presencia de hidrazina 1.0 mM a diferentes valores de pH: 3.0 (—), 5.0 (—), 7.0 (—), 9.0 (—) y 11.2 (—) a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Potenciales de pico en función del pH.

La mayor corriente catalítica (figura 2.18A) se obtiene para los valores de pH de 7.0 y 5.0. Por tanto, se eligió el pH 7.0 como pH de trabajo para los siguientes estudios.

### 2.5.1.2 Efecto de la velocidad de barrido en la oxidación catalítica de hidrazina

Con el objeto de elucidar el mecanismo por el que sucede la electrooxidación de hidrazina sobre los CSPE nanoestructurados con rGO-DHS, se estudió la influencia de la velocidad de barrido en este proceso. En la figura 2.19A se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de hidrazina 1.0 mM a diferentes velocidades de barrido. Se puede observar un desplazamiento en el potencial de pico anódico hacia valores más positivos al aumentar la velocidad de barrido, lo que indica una limitación cinética en la oxidación de hidrazina sobre el electrodo nanoestructurado.

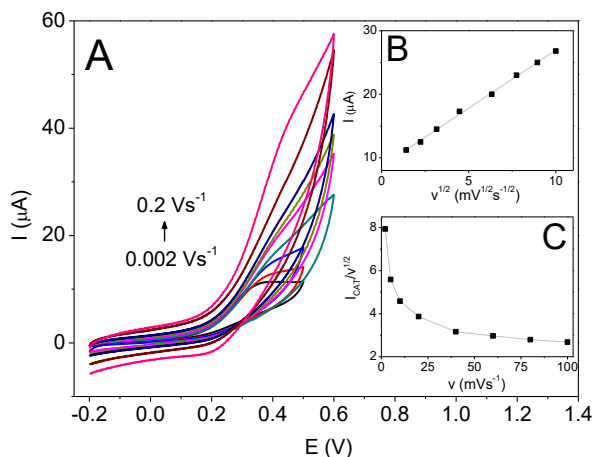


Fig. 2.19. (A) Voltamperogramas cíclicos de la oxidación de hidrazina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 sobre CSPE/rGO-DHS a diferentes velocidades de barrido. (B) Representación de la corriente catalítica en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. (C) Representación de la corriente catalítica normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad en función de la velocidad de barrido.

La corriente de pico anódico sigue una relación lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (figura 2.19B), lo que indica que el proceso catalítico está controlado por la difusión de la hidrazina hacia la superficie del electrodo.

La representación de la corriente de pico normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido frente a la velocidad de barrido (figura 2.19C) presenta la forma característica de un mecanismo EC catalítico [Nicholson, 1964]. De acuerdo con esto, se puede describir el proceso de oxidación de hidrazina sobre los CSPes nanoestructurados con rGO-DHS según el siguiente mecanismo:

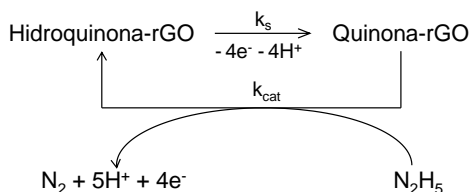


Fig. 2.20. Mecanismo de la oxidación electrocatalítica de hidrazina sobre CSPE/rGO-DHS.

Al potencial inicial de -0.2 V, el 3,4-DHS adsorbido sobre el rGO se encuentra reducido, de manera que los grupos funcionales presentes son hidroquinonas. Al aumentar el potencial, estas hidroquinonas se oxidan sobre la superficie del electrodo, formando quinonas, en un proceso rápido y gobernado por la constante de transferencia de carga entre el rGO-DHS y el electrodo ( $k_s$ ), calculada en el apartado 2.4.1.2. La presencia de hidrazina provoca la reducción de las quinonas en un proceso gobernado por la constante catalítica ( $k_{cat}$ ), de manera que el potencial aplicado vuelve a oxidar las hidroquinonas formadas, comenzando un nuevo ciclo catalítico. De esta manera, se explica el gran incremento en la corriente anódica y la disminución de la corriente catódica, ya que la oxidación de la hidrazina provoca la reducción del 3,4-DHS.

#### **2.5.1.3 Determinación de la constante catalítica para hidrazina**

La constante catalítica para la oxidación de hidrazina sobre los CSPE nanoestructurados con rGO-DHS ( $k_{cat}$ ) se estimó mediante cronoamperometría siguiendo el método de Galus [Galus, 1991], según se describe en la sección de materiales y métodos.

La representación de los valores de  $I_{CAT}/I_D$  respecto a la raíz cuadrada del tiempo de medida para distintas concentraciones de hidrazina se muestra en la figura 2.21. Cuando se representan los valores de las pendientes de estas rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración (fig. 2.21 inserto) se obtiene una nueva recta, a partir de cuya pendiente se calcula la constante catalítica. El valor obtenido para este sistema fue de  $(2.2 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

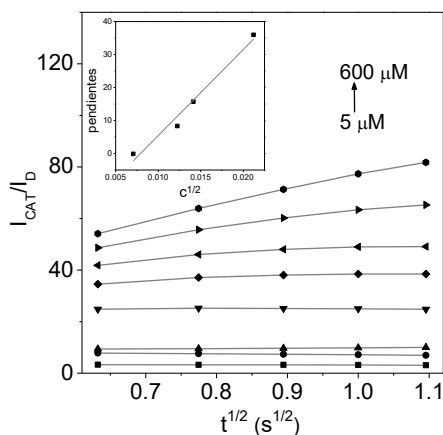


Fig. 2.21. Representación de  $I_{CAT}/I_D$  frente a  $t^{1/2}$  para hidrazina. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

Este valor es similar al obtenido en el capítulo anterior para las plataformas desarrolladas por nanoestructuración de CSPEs mediante diazotación y electroinjerto de nanotubos de carbono aminados en combinación con 3,4-DHS ( $2.93 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). El elevado valor de la constante asegura que los CSPE nanoestructurados con rGO-DHS exhiben un poder catalítico muy alto e indica que los CSPE nanoestructurados con rGO-DHS pueden ser empleados como sensores de hidrazina.

#### 2.5.1.4 Propiedades analíticas del sensor de hidrazina

Las propiedades como sensor de hidrazina de los CSPE nanoestructurados con rGO-DHS se determinaron mediante cronoamperometría. Se aplicó un pulso de potencial desde -0.60 V hasta +0.30 V. En los cronoamperogramas de la figura 2.22, correspondientes a concentraciones crecientes de hidrazina en disolución no agitada para asegurar control difusional, se puede observar que la estabilización de la corriente en estado estacionario ( $I_{ss}$ ) es rápida. La respuesta es lineal (figura 2.22 inserto) para concentraciones de hasta 1.5 mM, demostrándose así la capacidad de los electrodos nanoestructurados de actuar como sensores de hidrazina.



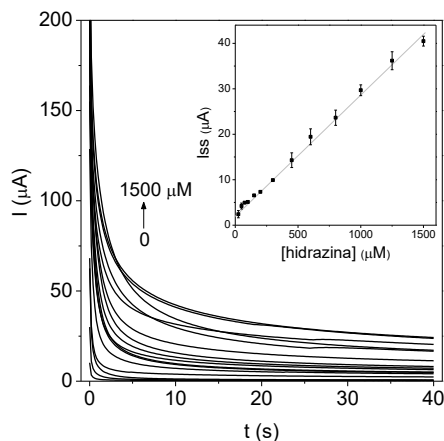


Fig. 2.22. Cronoamperogramas de la oxidación de hidrazina sobre CSPE/rGO-DHS en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Inserto: Corriente en el estado estacionario ( $I_{ss}$ ) a 39 segundos frente a la concentración de hidrazina.

La tabla 2.4 recoge los parámetros analíticos del sensor estimados a partir del tramo lineal de la curva de calibrado. De la pendiente del tramo lineal ( $y = 2.07x + 1.9$ ;  $R^2 = 0.992$ ) se obtuvo una sensibilidad de  $(2.07 \pm 0.06) \times 10^{-2} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación, calculados como la concentración que da una señal 3 y 10 veces superior a la desviación estándar de la corriente del blanco, respectivamente, fueron de 0.20  $\mu\text{M}$  y 0.65  $\mu\text{M}$ . La corriente del blanco se estimó para tres electrodos nanoestructurados sumergidos en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

Al comparar con otros sensores de hidrazina descritos en la bibliografía basados en el uso de grafeno reducido, el sensor desarrollado presenta unos parámetros analíticos similares o mejores. Por ejemplo, el trabajo de Aamen [Ameen, 2012] obtiene un límite de detección de 15.38 mM y el de Wang [Wang, 2010], de 1  $\mu\text{M}$ . En el sensor de hidrazina descrito en el capítulo anterior se obtiene un límite de detección de 6  $\mu\text{M}$ , con una sensibilidad de  $(1.90 \pm 0.01) \times 10^{-2} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ . El sensor desarrollado por nanoestructuración de CSPE con rGO-DHS presenta menor límite de detección y mayor sensibilidad.

Tabla 2.4. Parámetros analíticos obtenidos para la oxidación electrocatalítica de hidrazina sobre CSPE nanoestructurado con rGO-DHS.

Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)	Estabilidad
0.20	0.65	< 1.5	$2.07 \times 10^{-2}$	4.0	1 mes

Se calculó también el R.S.D. de la respuesta de tres sensores nanoestructurados distintos. Se obtuvo un valor del 4.0 % para una concentración de 5  $\mu\text{M}$ . Este valor es inferior al coeficiente de variación de Horwitz ( $\text{CV}_H$ ) calculado para esa concentración, 12.6 [Wood, 1999], por lo que se puede afirmar que la reproducibilidad del método desarrollado es buena.

Se evaluó la estabilidad del sensor desarrollado midiendo la respuesta a 1.0 mM de hidrazina tras un mes de almacenamiento a temperatura ambiente. Esta respuesta se mantuvo constante en todo el periodo.

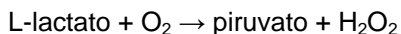
Los resultados obtenidos permiten concluir que los CSPE nanoestructurados con rGO-DHS reúnen las características necesarias para ser utilizados como sensores de hidrazina.

### 2.5.2 Desarrollo de un biosensor de lactato

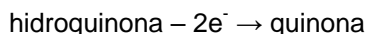
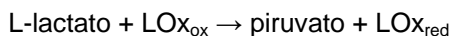
El lactato es un analito de interés clínico y agroalimentario. Su concentración en productos lácteos, tales como leche, yogur y cremas, así como en carnes crudas, frutas y vegetales es un indicador de la estabilidad, frescura y calidad de los alimentos. En el caso de los vinos, la fermentación maloláctica transforma el ácido málico en ácido láctico, produciendo un mejor sabor [Przybył, 2014].

Entre los métodos descritos para la determinación de lactato, el uso de biosensores amperométricos basados en reacciones enzimáticas presenta muchas ventajas, como son especificidad, selectividad, utilización de pequeños volúmenes de muestra, portabilidad y reproducibilidad [Parra, 2006a; Gamella, 2010]. De entre las enzimas utilizadas en el desarrollo de estos dispositivos destaca la lactato oxidasa (LOx), que

cataliza la conversión de lactato a piruvato en presencia de oxígeno, según la reacción:



Como ya se comentó en la introducción, el curso de esta reacción enzimática se puede seguir electroquímicamente tanto por la disminución de la concentración de  $\text{O}_2$  en la disolución como por el aumento de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, el alto sobrepotencial requerido para la determinación de ambas sustancias supone un inconveniente. Una forma de reducir el sobrepotencial necesario para llevar a cabo la tanto la reducción de  $\text{O}_2$  como la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y evitar así los problemas derivados de la presencia de interferentes es el uso de mediadores redox, que actúan como aceptores artificiales de los electrones implicados en el proceso, en sustitución del aceptor natural, que es el  $\text{O}_2$ . Las quinonas pueden actuar como mediador en la oxidación de lactato [Haccoun, 2004]. En este caso, la quinona se convierte en el aceptor de electrones y la corriente medida en el electrodo proviene de la oxidación de la hidroquinona, de acuerdo con las reacciones:



Dicha corriente es proporcional a la concentración de lactato. Debido a la presencia de grupos quinona en el rGO-DHS, se evaluó la posibilidad de desarrollar un biosensor basado en la nanoestructuración de un electrodo serigrafiado de carbono con rGO-DHS y posterior modificación con la enzima LOx. Para ello, sobre el CSPE nanoestructurado con rGO-DHS se depositó 1.0 U de LOx, como se describe en la sección de materiales y métodos. La respuesta ciclovoltamperométrica del biosensor en ausencia y en presencia de lactato 1.0 mM se muestra en la figura 2.23.

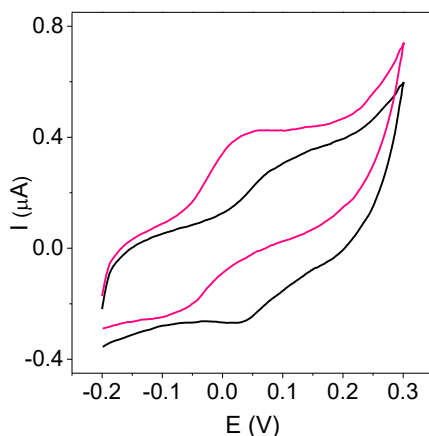


Fig. 2.23. Voltamperogramas cíclicos de CSPE/rGO-DHS modificados con LOx en ausencia (—) y en presencia (—) de lactato 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

En ausencia de lactato se puede observar que, incluso modificado con la enzima, aparece el par redox asociado a los grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHS que modifica al grafeno. En presencia de lactato se observa un aumento en la corriente anódica y una disminución en la corriente catódica, lo que se corresponde con un efecto electrocatalítico. Esto confirma que los electrones responsables de la reducción de la enzima se transfieren rápidamente al 3,4-DHS<sub>ox</sub> (quinona) inmovilizado, de manera que este se reduce y se inicia de nuevo el ciclo catalítico, según el esquema de la figura 2.24.

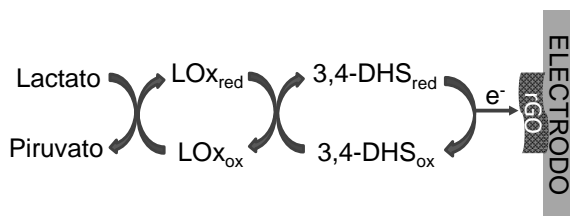


Fig. 2.24. Esquema de funcionamiento del biosensor basado en CSPE/rGO-DHS y LOx.

La corriente catalítica producida en el electrodo es proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra. Con el fin de comprobar que la respuesta catalítica del

biosensor se debe a la actividad de la enzima LOx inmovilizada, se estudió la respuesta de un CSPE nanoestructurado con rGO-DHS sin modificar con la enzima en presencia de lactato 1.0 mM (figura 2.25).

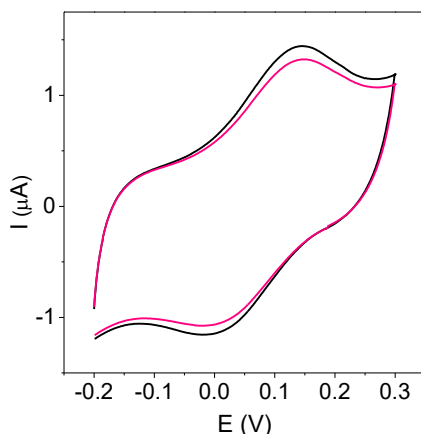


Fig. 2.25. Voltamperogramas cíclicos de CSPE/rGO-DHS en ausencia (—) y en presencia (—) de lactato 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como se puede observar, la adición de lactato (—) no produce variaciones en la respuesta voltamperométrica al compararla con la del CSPE en las mismas condiciones en ausencia de lactato (—).

Para conocer las condiciones óptimas de funcionamiento del biosensor, se estudió el efecto que produce en su respuesta la variación de parámetros tales como la cantidad de enzima inmovilizada o el pH de trabajo.

### 2.5.2.1 Efecto de la cantidad de enzima

Se prepararon varios biosensores preparados con diferentes cantidades de enzima inmovilizada, entre 0.3 y 2.0 U. A medida que se incrementan las unidades de enzima sobre el electrodo (figura 2.26), aumenta la respuesta del biosensor hasta 1.0 U. Mayores concentraciones de enzima producen una ligera disminución en la señal, probablemente debido al comienzo de la formación de una barrera que dificulta la transferencia de los electrones hacia la superficie del electrodo.

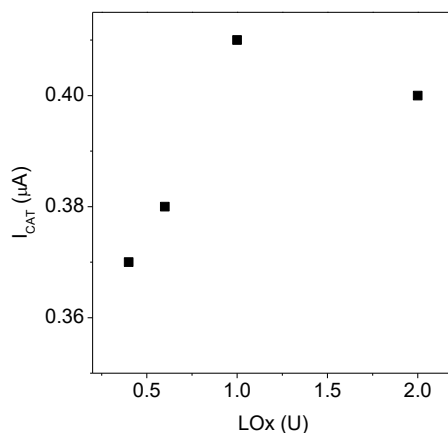


Fig. 2.26. Respuesta del biosensor preparado con diferentes cantidades de enzima LOx en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 conteniendo lactato 1.0 mM a  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Basándose en estos resultados, se eligió 1.0 U de LOx como la cantidad óptima de enzima para la modificación del CSPE nanoestructurado.

### 2.5.2.2 Efecto del pH

Debido a que en el proceso catalítico hay protones implicados y que la enzima tiene un pH de funcionamiento óptimo, se estudió la respuesta del biosensor frente a 1.0 mM de lactato en tampón fosfato 0.1 M a diferentes valores de pH: 6.0, 7.0 y 8.0.

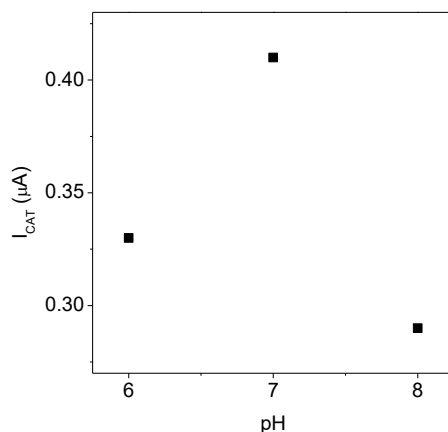


Fig. 2.27. Efecto del pH en la respuesta del biosensor a lactato 1.0 mM a  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como se puede observar en la figura 2.27, la mejor respuesta se obtiene para pH 7.0. Esto concuerda con lo descrito para otros biosensores de lactato basados en el uso de la enzima lactato oxidasa [Loaiza, 2015; Parra, 2006a]. Se eligió pH 7.0 como el óptimo para la determinación de lactato.

### 2.5.2.3 Propiedades analíticas del biosensor de lactato

Una vez halladas las condiciones óptimas de funcionamiento del biosensor, se estudió su respuesta frente a concentraciones crecientes de lactato mediante cronoamperometría. Se aplicó un potencial de +0.1 V. La curva de calibrado (figura 2.28) sigue el modelo de Michaelis-Menten, es decir, a partir de una determinada concentración de lactato, se alcanza una intensidad constante, como se espera de una reacción enzimática.

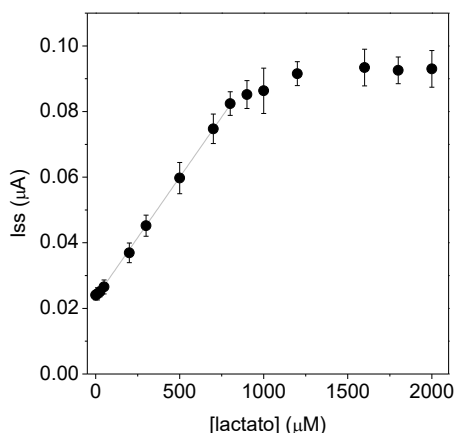


Fig. 2.28. Curva de calibrado obtenida de las medidas cronoamperométricas para CSPE/rGO-DHS modificado con LOx en presencia de concentraciones crecientes de lactato en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0.

Del tramo lineal de la curva de calibrado (hasta 800  $\mu\text{M}$ ), se obtuvieron los parámetros analíticos, que se encuentran resumidos en la tabla 2.5. A partir de la pendiente de la recta, se determinó la sensibilidad, que fue de  $7.3 \pm 0.1 \mu\text{A mM}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación se calcularon como las concentraciones para las que se obtendría una señal correspondiente a tres o diez veces la desviación

estándar del blanco. En este caso, los valores obtenidos fueron 2.9 y 9.7  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

El límite de detección obtenido es inferior al encontrado en la bibliografía para otros biosensores de lactato basados en el uso de lactato oxidasa. Por ejemplo, en el trabajo de Loaiza [Loaiza, 2015] se describe un biosensor basado en la modificación de CSPEs con nanopartículas de platino sobre nanofibras de carbono grafitizado, con un límite de detección de 6.9  $\mu\text{M}$  y en el de Parra [Parra, 2006a], dos biosensores basados en la adsorción y en la inmovilización covalente de LOx sobre electrodos de oro, con límites de detección de 10 y 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Tabla 2.5. Parámetros analíticos obtenidos para la oxidación electrocatalítica de lactato sobre CSPE nanoestructurado con rGO-DHS y modificado con LOx.

Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{M}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)	Estabilidad
2.9	9.7	< 800	$7.35 \times 10^{-5}$	8.9	82% tras 15 días

La reproducibilidad del biosensor desarrollado se estimó a partir de la respuesta de tres biosensores preparados siguiendo el mismo procedimiento. Se obtuvo un R.S.D. de 8.9 % para una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de lactato. Este valor es inferior a 10.2, que es el valor de  $CV_H$  calculado para esa concentración, asegurando que el biosensor de lactato desarrollado tiene una buena reproducibilidad.

Por último, se estudió la estabilidad del biosensor. Para ello se prepararon tres biosensores y durante dos semanas se midió su respuesta frente a lactato 0.5 mM, observándose que durante ese tiempo el biosensor mantiene un 82% de su actividad.

Estos resultados permiten concluir que el biosensor de lactato desarrollado presenta las características adecuadas para ser empleado en la determinación cuantitativa de lactato.



### 2.5.2.4 Estudio de interferentes

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta para cualquier aplicación analítica de biosensores es el estudio del efecto de sustancias potencialmente interferentes presentes en las muestras reales. Por tanto, para probar la utilidad del biosensor desarrollado en la determinación de lactato en diferentes muestras reales, tales como vino blanco, se llevó a cabo un estudio del efecto de la presencia de las sustancias potencialmente interferentes más habituales presentes en esas muestras. Con este propósito, se obtuvo la respuesta del biosensor en las condiciones experimentales óptimas en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acético, glucosa, fructosa, etanol y metanol. En la tabla 2.6 se muestra la respuesta relativa, definida como el cociente entre la respuesta a lactato 0.5 mM en presencia y en ausencia del potencial interferente, cuando este se encuentra en la misma concentración que el analito (1:1) o en concentración diez veces menor (1:0.1).

Tabla 2.6. Respuesta relativa del biosensor a lactato 0.5 mM en presencia de compuestos potencialmente interferentes.

Compuesto	Intensidad relativa	
	1:1	1:0.1
Ácido tartárico	1.05	0.97
Ácido cítrico	1.08	1.00
Ácido acético	1.16	0.88
Ácido ascórbico	1.76	1.08
Glucosa	1.07	0.96
Fructosa	1.01	0.99
Metanol	1.12	0.97
Etanol	1.10	0.94

De acuerdo con los resultados recogidos en la tabla 2.6, la presencia de los potenciales interferentes no afecta significativamente a la respuesta, incluso cuando se encuentran en la misma concentración que el analito, excepto en el caso del ácido ascórbico, donde se observó un aumento de la señal de alrededor de un 76%. Sin

embargo, a menores concentraciones, la presencia de este compuesto no mostró ningún efecto.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede afirmar que el biosensor desarrollado puede ser utilizado para determinar lactato directamente en muestras reales en presencia de una variedad de compuestos, sin requerir de tediosos pasos de separación previa del analito.

### 2.5.2.5 Determinación directa de lactato en un vino

Dada la selectividad del dispositivo se ensayó en la determinación de lactato directamente, sin procesos de separación previa, en vino blanco. Para que las condiciones de medida, es decir, el medio de trabajo y la concentración de la muestra, sean adecuadas, el vino se diluyó en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 (25  $\mu$ L en 10 mL). Además, para minimizar los efectos de matriz, se empleó el método de adición estándar en la determinación. La concentración determinada en el vino, a partir de los valores obtenidos utilizando tres biosensores diferentes, fue de  $1.57 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$ .

Para asegurar la validez de este resultado, se determinó la concentración de lactato en el vino utilizando un kit enzimático comercial. Este kit se basa en la determinación espectrofotométrica del NADH producido en la reacción enzimática de la L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), según se muestra en las reacciones siguientes.



Como el equilibrio (1) está muy favorecido en el sentido de L-lactato y  $\text{NAD}^+$ , es necesario acoplar otra reacción (2), catalizada por la enzima glutamato-piruvato transaminasa (D-GPT), que elimina el piruvato del medio, desplazando el equilibrio (1) hacia la producción de NADH.

La concentración de lactato obtenida en el vino utilizando este kit comercial fue de  $1.73 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$ . El resultado obtenido con el biosensor desarrollado es cercano

(90.1%) al valor obtenido empleando el kit comercial, por lo que se concluye que el biosensor desarrollado por nanoestructuración de CSPE con rGO-DHS y modificación con LOx es un método rápido y económico para la determinación de lactato, con el que se obtienen buenos resultados.

Tabla 2.7. Determinación de lactato en vino blanco con el biosensor desarrollado y con un kit enzimático comercial.

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de lactato (g/L) (biosensor LOx)</b>	<b>Contenido de lactato (g/L) (kit comercial)</b>
Vino blanco	$1.57 \pm 0.05$	$1.73 \pm 0.02$

## Capítulo 3

---



### 3. Síntesis de nanopartículas de oro con 3,4-DHS

---

Continuando con la línea de trabajo comenzada en el capítulo anterior de síntesis de nanomateriales modificados para su aplicación en plataformas electrocatalíticas, en este capítulo se plantea la síntesis en un solo paso de nanopartículas de oro modificadas con 3,4-DHS. Típicamente, la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) se lleva a cabo mediante la reducción de una sal de oro en presencia de un agente reductor. Debido a la tendencia de estas nanopartículas a agregarse, es necesaria la presencia de un agente estabilizante para mantenerlas en suspensión. En ocasiones, las características necesarias para actuar como agente reductor y estabilizante pueden reunirse en una sola molécula. Este es el caso de la síntesis de Frens [Frens, 1973], donde el citrato reduce la sal de oro y a la vez estabiliza las nanopartículas formadas.

En el trabajo descrito en este capítulo se ha pretendido ir un paso más allá y utilizar el 3,4-DHS como agente reductor y estabilizante en la síntesis de nanopartículas de oro modificadas con 3,4-DHS, produciendo nanoestructuras con un alto poder electrocatalítico, al ser depositadas sobre electrodos serigraviados de carbono, frente a la oxidación de hidrazina y la oxidación y reducción de peróxido de hidrógeno. Además, la detección del peróxido generado enzimáticamente sirve como base para el desarrollo de un biosensor para la determinación de lactato.

#### **3.1 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando 3,4-DHS como reductor**

En el capítulo anterior se demostró que el 3,4-DHS puede actuar como reductor en la reducción de óxido de grafeno a grafeno reducido. Este ligando, como ya se ha comentado, contiene grupos hidroquinona en su estructura. En la bibliografía se encuentran trabajos en los que se describe la preparación de nanopartículas de oro mediante reducción con hidroquinona [Sirajuddin, 2010]. Por lo tanto, se estudió la utilización de 3,4-DHS en la síntesis de nanopartículas de oro, como reductor de

$\text{HAuCl}_4$ . La viabilidad de esta síntesis se evaluó en primer lugar mezclando directamente concentraciones equimolares de disoluciones de  $\text{HAuCl}_4$  y 3,4-DHS. Se observó que la disolución inicial de color amarillo pálido fue cambiando a una dispersión coloidal de color rojo, indicando la formación de las AuNPs.

A diferencia del grafeno, en este caso no fue necesaria una alta temperatura para llevar a cabo la reacción, ya que el  $\text{AuCl}_4^-$  tiene tendencia a reducirse, debido a su alto potencial de reducción, +1.002 V [Vanýsek, 2009].

En la figura 3.1 se muestran los espectros de absorción y emisión de la dispersión de  $\text{HAuCl}_4$  y 3,4-DHS en el momento de la mezcla y tras 96 horas de reacción. En el espectro de absorción UV-visible (figura 3.1A) se puede observar que, tras la reacción, aparece la banda de plasmón superficial característica de las AuNPs a 536 nm (—), que no está presente al inicio de la reacción (—).

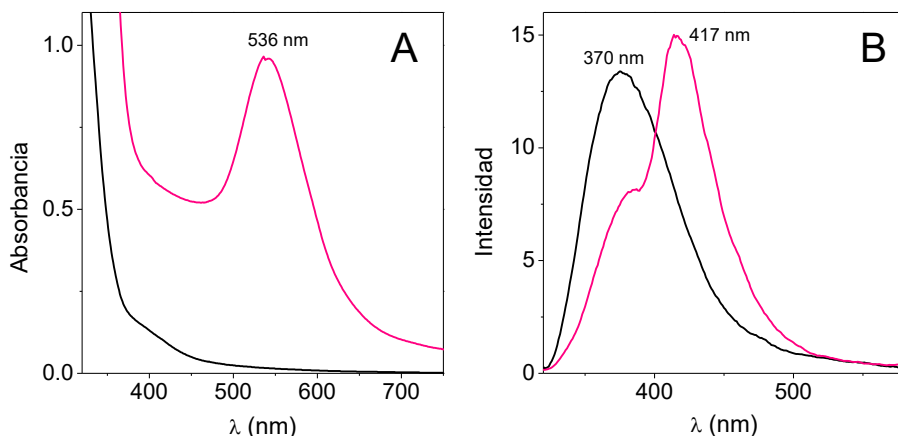
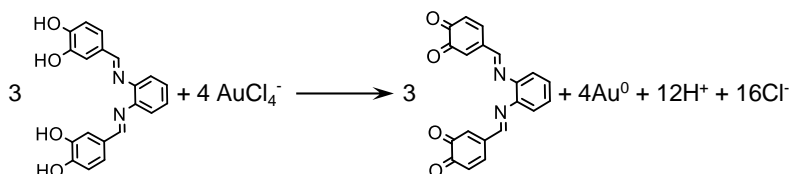


Fig. 3.1. Espectros de (A) absorción y (B) emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 310$  nm) de soluciones que contienen concentraciones equimolares (0.2 M) de  $\text{HAuCl}_4$  y 3,4-DHS en agua en el inicio de la reacción (—) y tras 96 horas (—).

Dado que el 3,4-DHS es una molécula fluorescente [Revenga-Parra, 2007] se registraron también los espectros de emisión (figura 3.1B), con una longitud de onda de excitación de 310 nm. Se puede observar que el 3,4-DHS presenta inicialmente una banda de emisión a 370 nm (—). Tras la reacción con el  $\text{HAuCl}_4$  (—), la intensidad de fluorescencia de esta banda disminuye y aparece una nueva banda a una longitud

de onda mayor, 417nm. Esta nueva banda se asocia al grupo quinona presente en el 3,4-DHS en su forma oxidada, resultado de la reducción del tetracloroaurato para dar lugar a las AuNPs.

La reacción global de reducción de  $\text{AuCl}_4^-$  por reacción con el 3,4-DHS es la siguiente:



Una vez confirmada la posibilidad de utilizar el 3,4-DHS como reductor para la síntesis de AuNPs, el siguiente paso fue establecer las condiciones óptimas de formación de las nanopartículas, para lo que se estudiaron distintos parámetros, como la relación molar entre  $\text{HAuCl}_4$  y 3,4-DHS, el pH o la temperatura de reacción.

### 3.1.1 Efecto de la relación molar de $\text{HAuCl}_4$ y 3,4-DHS

Las concentraciones, tanto de la sal de oro como del agente reductor, juegan un papel importante en la formación de los núcleos a partir de los cuales se forman las partículas y en el tamaño de las partículas resultantes [Turkevich, 1951; Frens, 1973]. Por este motivo se estudió la influencia de la relación de concentraciones entre el  $\text{HAuCl}_4$  y el 3,4-DHS en la síntesis propuesta. Para este estudio, la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  se mantuvo constante en 0.2 M y se fue variando la concentración de 3,4-DHS para obtener relaciones molares  $\text{AuCl}_4^-/\text{DHS}$  desde 1:5 hasta 5:1. Tras 24 horas de reacción, se registraron los espectros (figura 3.2) de absorción (A) y de emisión (B). Cuando únicamente está presente el 3,4-DHS (—) aparece la banda de absorción (A) a 310 nm, asociada a las transiciones  $\pi-\pi^*$  de los grupos fenólicos y la banda de emisión (B) a 370 nm, con una intensidad muy alta. Se puede observar que para una relación 1:5 (—) no se observa la banda de plasmón superficial (A), sin embargo la banda de fluorescencia característica del 3,4-DHS a 370 nm disminuye significativamente al compararla con la solución que solo contiene 3,4-DHS (—). Este hecho puede significar, bien la formación de pequeñas partículas de oro con un



tamaño inferior a 2 nm, por lo que no se apreciaría la banda del plasmón, o bien la formación de un complejo entre el Au (III) y el ligando, que estabilizaría la forma oxidada del oro, de manera que el potencial redox del 3,4-DHS no sería suficiente para reducirla.

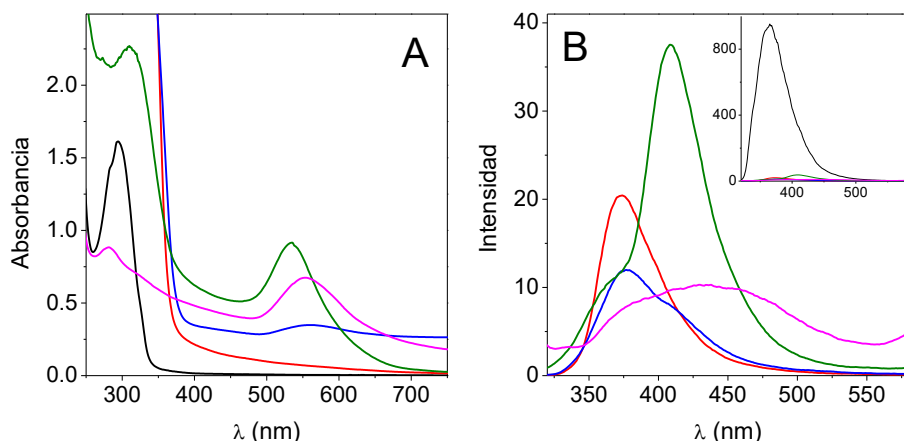


Fig. 3.2. Espectros de (A) absorción y (B) emisión de soluciones que contienen  $\text{HAuCl}_4$  0.2 M y 3,4-DHS en agua en diferentes proporciones molares: únicamente 3,4-DHS 0.1 M (—), 1:5 (—), 1:2 (—), 2:1 (—) y 5:1 (—) tras 24 horas de reacción. Inserto: ampliación de los espectros de emisión.

A medida que se va disminuyendo la concentración de 3,4-DHS (relaciones 1:2, 2:1 y 5:1), la banda del plasmón asociada a las AuNPs comienza a aparecer en el espectro de absorción (figura 3.2A). La relación 2:1 (—) produce una banda de plasmón estrecha y bien definida a 534 nm, lo que sugiere la formación de nanopartículas monodispersas. Para las relaciones 1:2 (—) y 5:1 (—), se observan bandas más anchas y desplazadas a mayores longitudes de onda, indicando que las nanopartículas formadas son de mayor tamaño y polidispersas. En los espectros de emisión (figura 3.2B) se observa que, con la formación de las nanopartículas, la intensidad de fluorescencia a 370 nm disminuye y aparece una nueva banda de emisión a 417 nm, atribuida a la forma oxidada del 3,4-DHS (3,4-DHS<sub>ox</sub>) producida en el transcurso de la reacción. La amortiguación de la fluorescencia del 3,4-DHS se debe a la presencia de las nanopartículas, que pueden actuar como eficientes amortiguadores del estado excitado [Ipe, 2002].

Se estudió también la relación molar estequiométrica, 4:3. La banda de plasmón superficial es similar a la obtenida para la relación 2:1 (figura 3.3A), sin embargo, la intensidad de fluorescencia de la banda a 417 nm es menor (figura 3.3B).

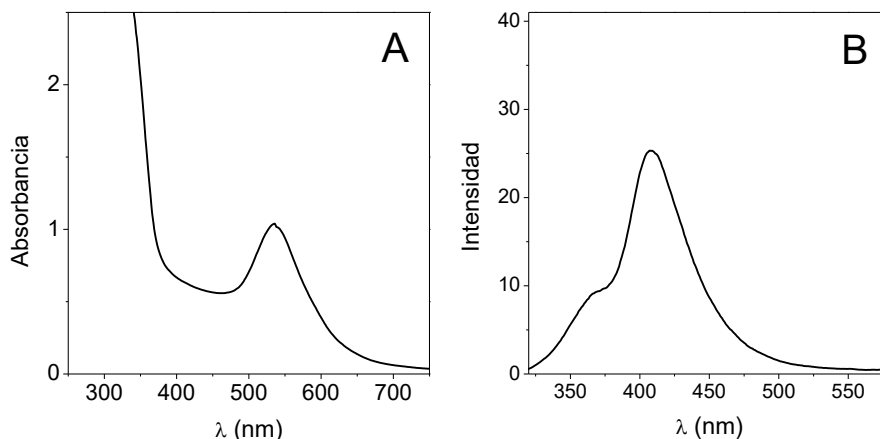


Fig. 3.3. Espectros de (A) absorción y (B) emisión de una solución que contiene  $\text{HAuCl}_4$  0.2 M y 3,4-DHS 0.15 M en agua (proporción molar 4:3) tras 24 horas de reacción.

Teniendo en cuenta que con la relación 2:1 se obtienen nanopartículas monodispersas de pequeño tamaño, se eligió como relación óptima para la síntesis de las nanopartículas de oro. Esta relación se alcanza utilizando concentraciones de 0.2 M y 0.1 M para  $\text{HAuCl}_4$  y 3,4-DHS, respectivamente.

### 3.1.2 Efecto del pH en la síntesis de nanopartículas de oro

Estudios previos de interacción de AuNPs con 3,4-DHS muestran que el pH al que sucede esta interacción es un factor importante a tener en cuenta [Abad, 2011]. Por este motivo, se estudió la influencia del pH de la solución de partida en la síntesis para valores de pH entre 5.0 y 9.0. El pH se ajustó con HCl o con NaOH, para evitar la interferencia de las sales presentes en las disoluciones reguladoras de pH en el proceso.

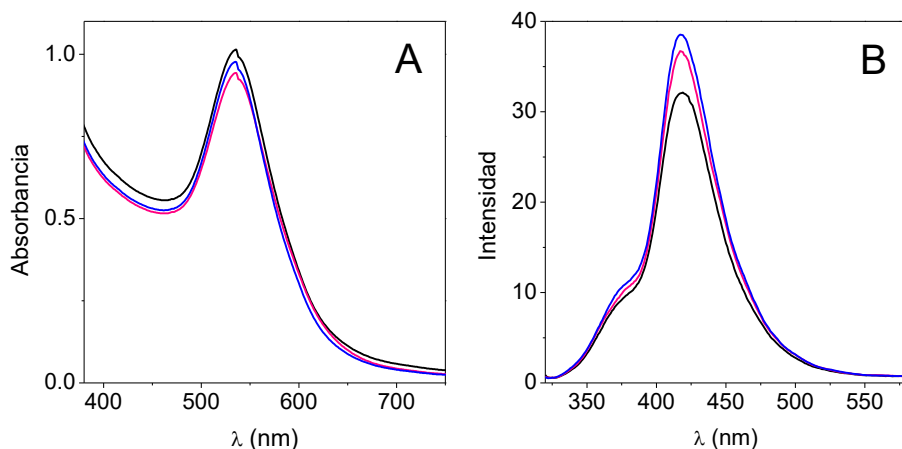


Fig. 3.4. Espectros de (A) absorción y (B) emisión de una solución que contiene  $\text{HAuCl}_4$  0.2 M y 3,4-DHS 0.1 M en agua a pH 5.0 (—), pH 7.0 (—) y pH 9.0 (—) tras 24 horas de reacción.

Al observar los espectros de absorción (figura 3.4A) se puede concluir que no existen diferencias significativas al variar el pH de partida. En todos valores de pH estudiados se observa un máximo a 534 nm, con la única diferencia de una absorbancia ligeramente mayor para pH 5.0 (—). De manera similar, los espectros de emisión (figura 3.4B) no muestran cambios significativos al variar el pH. En todos los casos se observa la disminución de la intensidad de la banda a 370 nm y la aparición de la nueva banda a 417 nm.

Basado en la ausencia de variaciones con el pH, tanto en los espectros de absorción como en los de emisión, se puede concluir que en el intervalo de pH estudiado, este factor es irrelevante para la formación de las nanopartículas de oro.

### 3.1.3 Influencia de la temperatura

Otro de los factores que puede influir en el proceso de formación de las nanopartículas, en concreto en la morfología y tamaño, es la temperatura [Turkevich, 1985], por lo que se estudió la influencia de esta con la intención de obtener un tamaño menor de partícula al disminuir la temperatura.

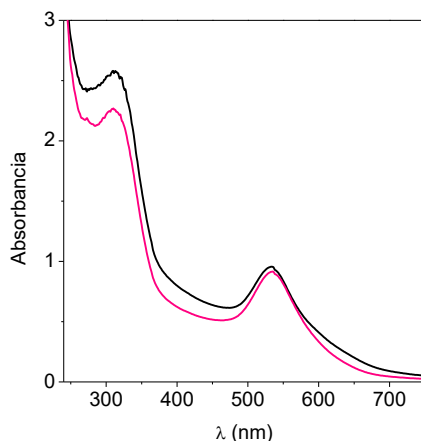


Fig. 3.5. Espectros de absorción de una solución que contiene HAuCl<sub>4</sub> 0.2 M y 3,4-DHS 0.1 M en agua a pH 20 °C (—) y a 4 °C (—) tras 24 horas de reacción.

Como se puede apreciar en la figura 3.5, el espectro de absorción de las nanopartículas de oro sintetizadas a 4 °C es muy similar al obtenido cuando la síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, indicando que la temperatura no tiene efecto aparente.

### 3.1.4 Estudio cinético de la formación de las nanopartículas de oro

Con objeto de entender la cinética del proceso de la síntesis de nanopartículas, se estudió la evolución de los espectros de absorción y emisión en función del tiempo. Para ello, se registraron los espectros inmediatamente tras la mezcla de los reactivos y durante 24 horas.

Los espectros de absorción de la figura 3.6 muestran que la banda de plasmón superficial centrada a 534 nm es claramente visible tras 10 minutos de reacción y aumenta en intensidad con el tiempo hasta su estabilización a las 6 horas. Además, la banda del 3,4-DHS centrada a 290 nm, atribuida a las transiciones  $n-\pi^*$ , se desplaza hacia el rojo 10 nm tras la reacción. Este desplazamiento se puede adscribir a la interacción del O del fenolato con el núcleo metálico [Lezna, 1991]. El ligando se encuentra quimisorbido al oro presumiblemente a través de los fenolatos formados por ruptura del enlace OH, con una orientación perpendicular a la superficie de la

nanopartícula, lo que promueve las interacciones  $\pi$  entre los orbitales fenólicos adyacentes a la nanopartícula. Además, se pueden formar simultáneamente agregados J entre las moléculas de 3,4-DHS y 3,4-DHS<sub>ox</sub> sobre las nanopartículas, dando lugar al desplazamiento al rojo de la banda de absorción (banda J) con respecto a la del monómero [Abad, 2011]. En los agregados, las moléculas se encuentran unidas unas a otras por uniones cabeza-cola, a través de enlaces de hidrógeno, fuerzas atractivas de van der Waals e interacciones  $\pi$ - $\pi$ . Li y colaboradores describen de forma similar la interacción entre dos moléculas vecinas a través de la unión del grupo azometino en una molécula y el anillo fenólico en la otra [Li, 2004].

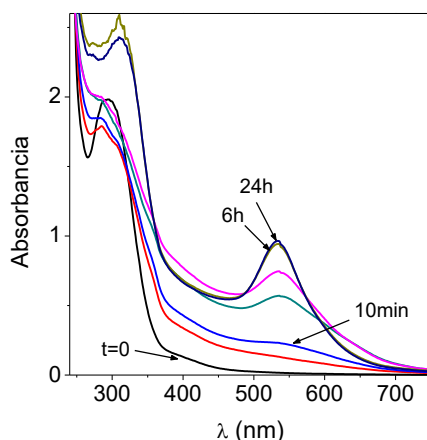


Fig. 3.6. Espectros de absorción de una solución que contiene HAuCl<sub>4</sub> 0.2 M y 3,4-DHS 0.1 M en agua durante 24 horas de reacción.

En la figura 3.7A se muestran los espectros de emisión a lo largo de 24 horas de reacción. Se puede observar la presencia de las dos bandas descritas anteriormente, una a 370 nm, asociada con la forma reducida de 3,4-DHS y la otra a 417 nm, asociada a la forma oxidada, 3,4-DHS<sub>ox</sub>. En la figura la 3.7B se muestra la variación de la intensidad de emisión de ambas bandas durante el transcurso de la reacción. La banda a 370 nm disminuye hasta casi desaparecer a los 15 minutos de reacción y se va recuperando con el tiempo, alcanzando un valor constante pasados 60 minutos. Esto se puede explicar por la formación de un complejo entre el 3,4-DHS y los iones de oro, y a que, a medida que el oro se va reduciendo, el 3,4-DHS se libera y se

recupera la fluorescencia. Esto concuerda con el proceso de nucleación descrito por Turkevich, según el cual los iones de oro forman un complejo con el agente reductor hasta alcanzar un tamaño en el que se produce la reducción a oro metálico [Turkevich, 1951]. La recuperación de la fluorescencia puede estar relacionada también con la formación de agregados J, que produce un aumento de la fluorescencia [Jelley, 1936; Kobayashi, 1996].

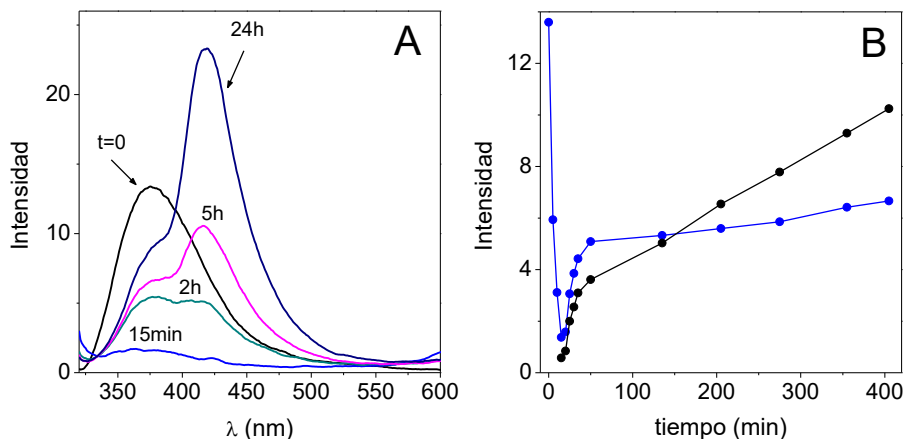


Fig. 3.7. (A) Espectros de emisión de una solución que contiene  $\text{HAuCl}_4$  0.2 M y 3,4-DHS 0.1 M en agua durante 24 horas de reacción. (B) Emisión durante el transcurso de la reacción a 370 nm (—●—) y a 417 nm (—●—) durante 7 horas de reacción.

Se puede observar también la aparición de la banda a 417 nm, que va aumentando con el tiempo al irse oxidando el 3,4-DHS en el proceso de reducción del oro e incorporación de las moléculas de 3,4-DHS<sub>ox</sub> en los agregados J. De esta manera, se forma un par aceptor-donador conjugado, lo que provoca que esta banda presente una mayor fluorescencia.

## 3.2 Caracterización de las nanopartículas sintetizadas

### 3.2.1 Caracterización mediante espectrofotometría

Las AuNPs sintetizadas se encuentran rodeadas por moléculas de 3,4-DHS formando nanoestructuras AuNPs-DHS. Para eliminar las moléculas de 3,4-DHS que no se

encuentran fuertemente adsorbidas se centrifugó la disolución y se estudiaron las características tanto del filtrado, como del precipitado.

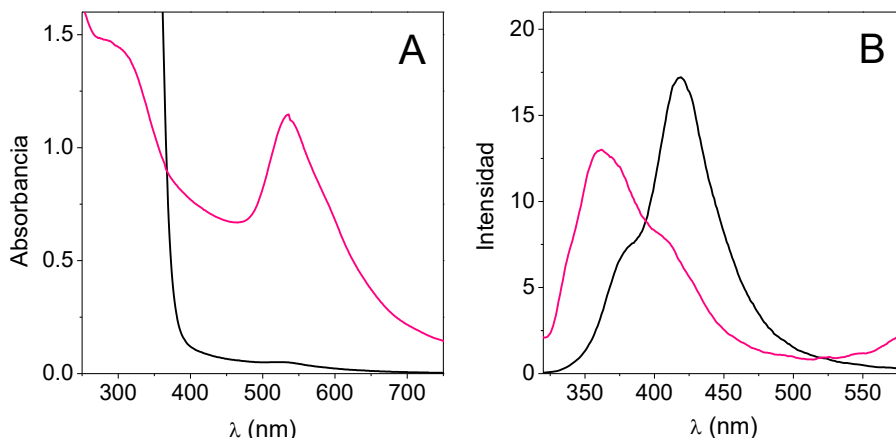


Fig. 3.8. Espectros de absorción (A) y emisión (B) de las nanopartículas sintetizadas tras su centrifugación: filtrado (—) y precipitado (—).

En el espectro de absorción del filtrado (figura 3.8A —) prácticamente no se observa la banda de plasmón superficial, lo que significa ausencia de AuNPs. En el espectro de emisión (figura 3.8B —) se observa principalmente la banda a 417 nm y un hombro a 370 nm. La primera corresponde a los agregados J formados por 3,4-DHS<sub>ox</sub> y la segunda, a las moléculas de 3,4-DHS sin reaccionar.

Por el contrario, el precipitado de AuNPs-DHS, resuspendido en agua tras la centrifugación, muestra la característica banda de plasmón superficial (figura 3.8A —), indicando la presencia de las AuNPs. El espectro de emisión (figura 3.8B —) muestra una banda a 370 nm, asociada a las moléculas de 3,4-DHS unidas al oro y un hombro a 417 nm, asociado a las moléculas de 3,4-DHS<sub>ox</sub> que se encuentran formando agregados J sobre las nanopartículas.

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que las moléculas de 3,4-DHS recubren a las AuNPs y se rodean de agregados de 3,4-DHS<sub>ox</sub>.

### 3.2.2 Caracterización mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

La caracterización estructural de las nanopartículas obtenidas se realizó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El espectro de infrarrojo de las nanoestructuras AuNPs-DHS (figura 3.9) muestra las bandas características asociadas a los modos vibracionales de los grupos fenólicos y azometino, pero cabe destacar que también se observan bandas asociadas a grupos benzoquinona. La banda a  $1665\text{ cm}^{-1}$  se asigna a la tensión de  $\text{CH}=\text{N}$  y las bandas a  $1600$ ,  $1493$  y  $1452\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos vibracionales de  $-\text{C}=\text{C}-$  aromáticos y  $\text{C}-\text{O}$  del anión fenolato. La aparición de bandas de absorción alrededor de  $1730\text{ cm}^{-1}$  y de la banda a  $1705\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen al grupo  $\text{C}=\text{O}$  de la quinona. Las bandas en la región de  $1160\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a las tensiones  $\text{C}-\text{O}$  del grupo fenolato.

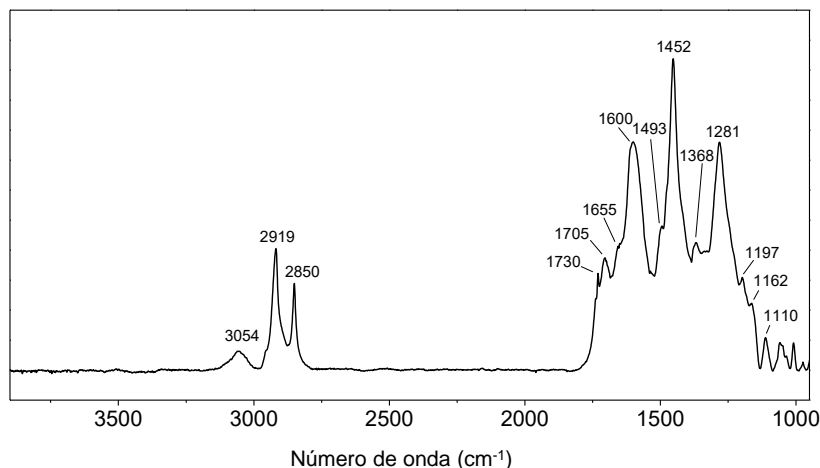


Fig. 3.9. Espectro FTIR de las nanopartículas sintetizadas.

Llama la atención que no se observa ninguna banda de absorción del grupo  $-\text{OH}$  [Abad, 2011], lo que indica que las hidroquinonas se encuentran en forma de fenolatos. Finalmente, las bandas a  $3054$ ,  $2919$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos vibracionales  $\nu_{\text{sim}}$  ( $-\text{CH}$ ) del anillo aromático,  $\nu_{\text{asim}}$  ( $-\text{CH}_2$ ) y  $\nu_{\text{sim}}$  ( $-\text{CH}_2$ ), respectivamente.



Tabla 3.1. Modos vibracionales presentes en el espectro FTIR de las AuNPs-DHS.

banda IR (cm <sup>-1</sup> )	modo vibracional
1160-1390	C-O
1452, 1493	C-O
1600	-C=C-
1665	CH=N
1705, 1730	C=O
2850	-CH <sub>2</sub> asim
2919	-CH <sub>2</sub> sim
3054	-CH <sub>sim</sub>

Estos resultados confirman la composición de las nanopartículas modificadas con 3,4-DHS deducida con base en los estudios de absorción y fluorescencia realizados y discutidos en el apartado anterior.

### 3.2.3 Caracterización mediante espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman detecta los modos vibracionales de los grupos funcionales de las moléculas. La espectroscopía Raman amplificada en superficie (SERS) consiste en el aumento de la intensidad Raman de las moléculas situadas en la proximidad de una superficie metálica, basada en la amplificación del campo electromagnético efectivo en la superficie de nanoestructuras metálicas. Así, cuando la longitud de onda de excitación entra en resonancia con el plasmón de las nanopartículas, los modos localizados del plasmón superficial se excitan y se induce un fuerte campo electromagnético en la superficie metálica. Las variaciones en la intensidad Raman de los diferentes modos en los espectros SERS se explican de acuerdo a la reglas de selección [Gao, 1990]. De esta manera, se pueden caracterizar las moléculas según su orientación con respecto a la superficie metálica. La amplificación de los modos activos en Raman depende de los componentes paralelo y perpendicular a la superficie del campo electromagnético. Únicamente se observarán las vibraciones con un dipolo dinámico normal a la superficie. En general, los modos Raman con una orientación paralela a la superficie son indetectables o producen una señal muy débil [Cialla, 2014].

Con el objetivo de determinar la orientación de las moléculas del 3,4-DHS sobre la superficie de las AuNPs, se registró el espectro SERS de las AuNPs-DHS sintetizadas. Este espectro se comparó con el espectro Raman de 3,4-DHS para diferenciar cuáles son los modos activos e inactivos en SERS. Se utilizó un láser de excitación de 785 nm, ya que si se utilizara una longitud de onda más corta, la fluorescencia del 3,4-DHS enmascararía la señal Raman. Ambos espectros se muestran en la figura 3.10.

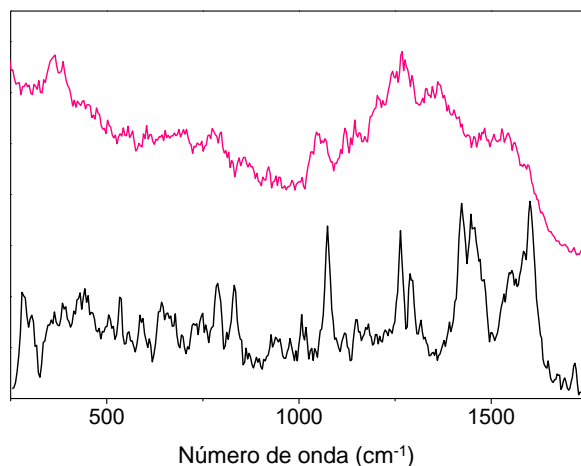


Fig. 3.10. Espectros Raman de las AuNPs-DHS sintetizadas (—) y de 3,4-DHS (—).

La asignación de bandas se realizó mediante comparación con una molécula similar [de Toledo, 2015]. Para el cálculo teórico se utilizó el programa Gaussian 09 [Frisch, 2009], utilizando Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) con el funcional B3LYP y empleando la base 6-31G\*\*. Los modos vibracionales se han referido a la numeración de los átomos de carbono de la estructura de la molécula de 3,4-DHS de la figura 3.11. Para mayor claridad, se ha dividido la molécula mediante un plano de simetría, ya que los grupos funcionales duplicados producen los mismos modos vibracionales.

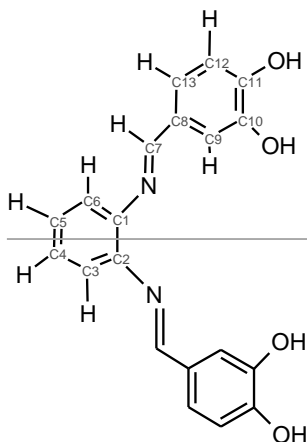


Fig. 3.11. Representación esquemática de los átomos que forman el 3,4-DHS. La línea gris representa un plano de simetría.

En la tabla 3.2 se recogen las bandas presentes en los espectros Raman y SERS del 3,4-DHS y de las AuNPs-DHS, respectivamente. Las bandas entre 280 y 365  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la torsión C-C=C-C de la imina y el anillo fenólico. Las bandas entre 385 y 505  $\text{cm}^{-1}$  se asocian a las flexiones C=C-O y C-C=C de la imina y el anillo fenólico. La banda alrededor de 790  $\text{cm}^{-1}$  se debe a la torsión C-C=C-H de los anillos fenólicos y la banda alrededor de 1070  $\text{cm}^{-1}$ , así como la banda a 1482  $\text{cm}^{-1}$ , a la flexión C=C-H del anillo central. Las bandas entre 1180 y 1324  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a la tensión C=C del enlace opuesto al que une los dos carbonos unidos al oxígeno, a la flexión C=C-H del anillo fenólico y a la tensión C-O. La banda centrada a 1604  $\text{cm}^{-1}$  se debe a la tensión C=C del anillo central. Todas estas bandas aparecen en ambos espectros. Sin embargo, las bandas a 831, 1423 y 1448  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la torsión de C=C-O-H, a la flexión N=C-H y a la flexión C-O-H, respectivamente, no aparecen en el espectro SERS de las AuNPs-DHS. La ausencia de las bandas del grupo OH ya se observó en el estudio mediante FTIR y se puede explicar por la unión del 3,4-DHS a las AuNPs a través del O de fenolato. La ausencia de la banda de flexión N=C-H en el espectro SERS significa que este modo vibracional sucede de manera paralela a la superficie de las nanopartículas. Esto indica que las moléculas de 3,4-DHS se unen al oro a través de los oxígenos y se colocan de manera perpendicular a la superficie de la nanopartícula.

Tabla 3.2. Modos vibracionales presentes en el espectro Raman del 3,4-DHS y en el espectro SERS de las AuNPs-DHS ( $\nu$ , tensión;  $\delta$ , flexión;  $\tau$ , torsión). Los parámetros de medida son: potencia de láser de 2 mW, tiempo de integración de 0.5 s y objetivo 50x.

modo vibracional	banda Raman 3,4-DHS ( $\text{cm}^{-1}$ )	SERS AuNPs-DHS ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\tau$ C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> =C <sub>13</sub> -C <sub>12</sub>	280-365	280-362
$\delta$ C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> =C <sub>13</sub>	385-505	385-505
$\delta$ C <sub>9</sub> =C <sub>10</sub> -O, C <sub>12</sub> =C <sub>11</sub> -O	385-505	385-505
$\tau$ C <sub>10</sub> -C <sub>11</sub> =C <sub>12</sub> -H	789	794
$\tau$ C <sub>9</sub> =C <sub>10</sub> -O-H, C <sub>12</sub> =C <sub>11</sub> -O-H	831	-
$\delta$ C <sub>5</sub> =C <sub>6</sub> -H	1074	1070
$\nu$ C <sub>8</sub> =C <sub>13</sub>	1180-1318	1187-1324
$\delta$ C <sub>12</sub> =C <sub>13</sub> -H	1180-1318	1187-1324
$\nu$ C <sub>10</sub> -O, C <sub>11</sub> -O	1180-1318	1187-1324
$\delta$ N=C <sub>7</sub> -H	1423	-
$\delta$ C <sub>10</sub> -O-H, C <sub>11</sub> -O-H	1447	-
$\delta$ C <sub>4</sub> =C <sub>5</sub> -H	1482	1482
$\nu$ C <sub>1</sub> =C <sub>6</sub>	1604	1600

Los resultados obtenidos mediante FTIR y Raman confirman que las nanopartículas de oro se encuentran rodeadas por moléculas de 3,4-DHS quimisorbidas a través de los grupos fenolato y que las moléculas de 3,4-DHS<sub>ox</sub> forman una capa alrededor de ellas, como se muestra en la figura 3.12, dando lugar a la formación de agregados J.

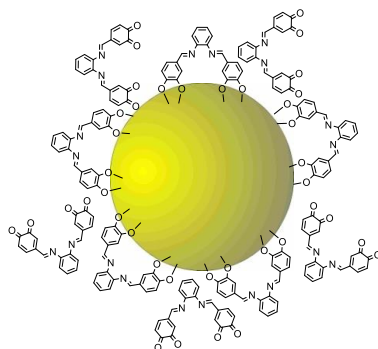


Fig. 3.12. Representación esquemática de la disposición de las moléculas de 3,4-DHS sobre las nanopartículas.

### 3.2.4 Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se realizó también una caracterización morfológica de las nanopartículas sintetizadas. En las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la figura 3.13, se puede observar que las AuNPs sintetizadas muestran una buena monodispersidad y presentan una forma aproximadamente esférica, con un grado de facetado debido a su naturaleza cristalina. Además, las nanopartículas aparecen como estructuras aisladas sin formar agregados, lo que confirma que el 3,4-DHS actúa efectivamente como estabilizante de las partículas generadas, además de como reductor.

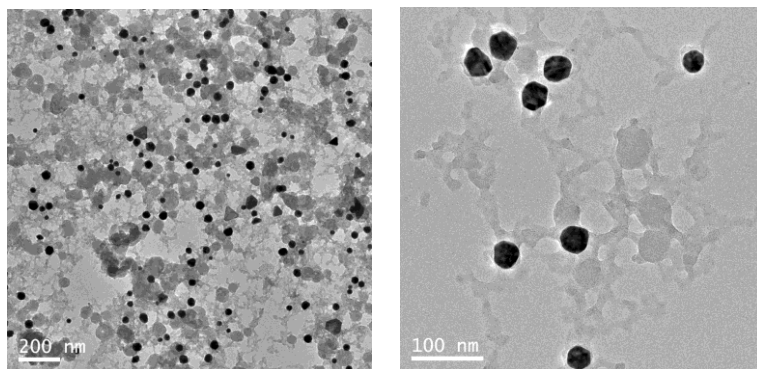


Fig. 3.13. Imágenes de TEM de las nanopartículas sintetizadas.

El tamaño de diámetro medio determinado a partir de las imágenes de TEM fue de  $33 \pm 3$  nm. Este tamaño es cercano al calculado teóricamente a partir de la relación de absorbancias medidas a 534 nm (en la banda del plasmón superficial) y a 450 nm [Haiss, 2007], como se describe en la sección de materiales y métodos.

### 3.3 Propiedades electrocatalíticas de las plataformas CSPes/AuNPs-DHS

Las nanoestructuras AuNPs-DHS preparadas presentan grupos quinona expuestos a la disolución, por lo que pueden mostrar actividad electrocatalítica frente a moléculas de interés, tales como NADH o hidrazina [Revenga-Parra, 2005; Bravo, 2015]. Las nanopartículas de oro, por su parte, también presentan actividad electrocatalítica, por ejemplo, frente a la reducción de oxígeno [Shim, 2011; Hernández, 2005] o peróxido

de hidrógeno [Das, 2008]. Por estos motivos, la modificación de electrodos con estas nanoestructuras puede ser valiosa para el desarrollo de nuevas plataformas nanoestructuradas con aplicaciones en procesos catalíticos y sensores.

Con este propósito, se modificaron electrodos serigrafiados de carbono (CSPEs) con las nanoestructuras AuNPs-DHS por adsorción directa de la dispersión coloidal sobre la superficie del electrodo y se estudió la respuesta ciclovoltamperométrica de los electrodos nanoestructurados resultantes.

### 3.3.1 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante voltamperometría cíclica

En la figura 3.14 se muestra el voltamperograma del electrodo nanoestructurado con AuNPs-DHS (CSPEs/AuNPs-DHS) en NaOH 0.1 M. Se puede observar el par redox característico, con picos anódico y catódico centrados en -0.28 y -0.36 V, respectivamente, asociado a la oxidación/reducción de los grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHS.

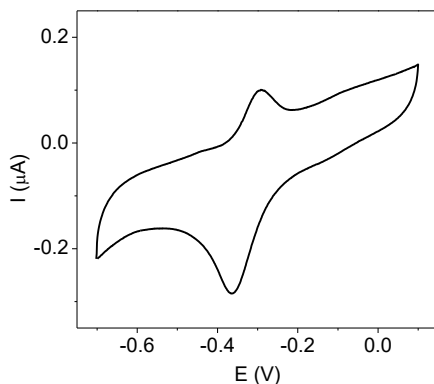


Fig. 3.14. Voltamperograma cíclico de CSPE/AuNPs-DHS en NaOH 0.1 M a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 3.3.1.1 Efecto del pH

Se estudió la influencia del pH en la respuesta ciclovoltamperométrica de los electrodos nanoestructurados con AuNPs-DHS, debida a los grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHS.

Como era de esperar para sistemas redox que implican protones, a medida que aumenta el pH del medio, los potenciales formales se desplazan a valores más negativos (figura 3.15A).

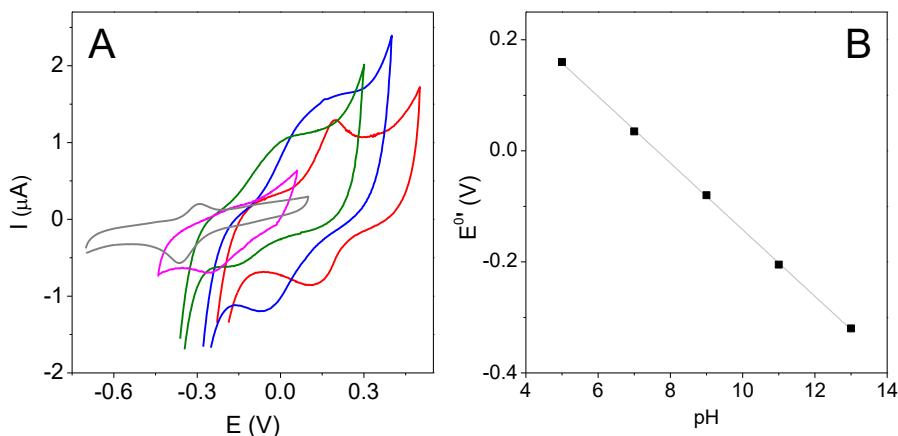


Fig. 3.15. (A) Voltamperogramas cíclicos de CSPEs/AuNPs-DHS a diferentes pHs: 5.0 (—), 7.0 (—), 9.0 (—), 11.2 (—) y 13.0 (—) a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Dependencia lineal del potencial formal con el pH.

La representación del potencial formal ( $E^0$ ) frente al pH presenta una relación lineal (figura 3.15B). El valor de la pendiente,  $-60.0 \text{ mV/unidad de pH}$ , indica que se intercambia el mismo número de protones que de electrones, en este caso dos protones y dos electrones por cada grupo quinona/hidroquinona.

### 3.3.1.2 Efecto de la velocidad de barrido

Con el fin de conocer más profundamente el sistema, se estudió la respuesta voltamperométrica de los electrodos nanoestructurados en función de la velocidad de barrido. En los voltamperogramas cíclicos en tampón fosfato  $0.1 \text{ M}$  pH 7.0 a velocidades de barrido inferiores a  $0.6 \text{ V s}^{-1}$  de la figura 3.16A se puede apreciar que el potencial formal ( $E^0=0.08 \text{ V}$ ) es prácticamente constante a velocidades inferiores a  $0.6 \text{ V s}^{-1}$ . Las intensidades de pico anódico y catódico presentan una dependencia lineal con la velocidad de barrido en el intervalo estudiado, como se espera de un par redox confinado en la superficie del electrodo (figura 3.16B).

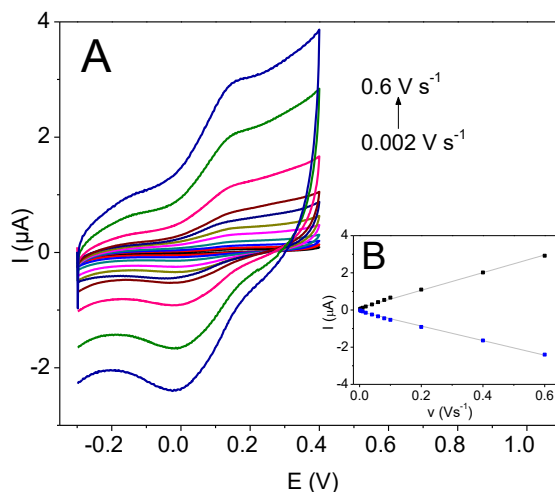


Fig. 3.16. (A) Voltamperogramas cíclicos de CSPEs/AuNPs-DHS a pH 7.0 a velocidades de barrido inferiores a  $0.6 \text{ V s}^{-1}$ . (B) Variación de la intensidad de corriente anódica (—) y catódica (—) con la velocidad de barrido.

En la figura 3.17A se muestran los voltamperogramas para velocidades de barrido más elevadas. La separación de picos ( $\Delta E_p$ ) es  $0.11 \text{ V}$ , lejos del valor 0 esperado para un proceso redox reversible confinado en la superficie del electrodo y aumenta significativamente para velocidades de barrido superiores a  $1 \text{ V s}^{-1}$ , lo que sugiere limitaciones severas en la transferencia de carga (figura 3.17B) a estas altas velocidades.



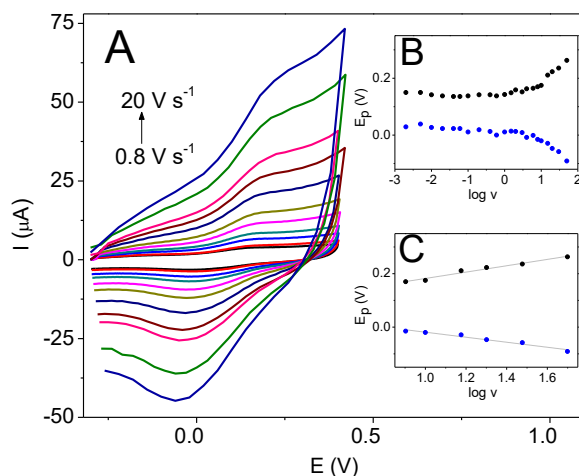


Fig. 3.17. (A) Voltamperogramas cíclicos de CSPEs/AuNPs-DHS a pH 7.0 a velocidades de barrido superiores a  $0.8 \text{ V s}^{-1}$ . (B) Variación del potencial de pico anódico (—) y catódico (—) con el logaritmo de la velocidad de barrido para CSPEs/AuNPs-DHS modificados con 3,4-DHS a pH 7.0 a diferentes velocidades de barrido. (C) Ampliación para velocidades de barrido superiores a  $8 \text{ V s}^{-1}$ .

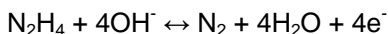
Los potenciales de pico anódico y catódico se representaron frente al logaritmo de la velocidad (figura 3.17C) en el típico gráfico de Laviron [Laviron, 1979]. A velocidades de barrido superiores a  $8 \text{ V s}^{-1}$ , los potenciales de pico presentan una dependencia lineal con el logaritmo de la velocidad. A partir de las pendientes de esas rectas se calcularon el coeficiente de transferencia de carga ( $\alpha$ ) y la constante heterogénea de transferencia de carga ( $k_s$ ). Los valores obtenidos fueron  $0.50$  y  $47 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

El valor de  $k_s$  para AuNPs-DHS es mayor que el obtenido con rGO-DHS de  $8.92 \text{ s}^{-1}$ , lo que se puede explicar teniendo en cuenta el carácter metálico del oro depositado sobre el carbono. El valor de  $\alpha$  indica que se trata de un proceso totalmente reversible, ya que la oxidación y la reducción están favorecidas por igual.

### 3.3.2 Oxidación electrocatalítica de hidrazina

Se estudió la actividad electrocatalítica de los electrodos nanoestructurados con AuNPs-DHS frente a la oxidación de hidrazina mediante voltamperometría cíclica.

Existen ejemplos en la bibliografía en los que la mejor respuesta electrocatalítica de diferentes electrodos modificados frente a la catálisis de esta molécula se observa a pH básico [Ozoemena, 2006; Zhang, 1996; Isaacs, 1998; Li, 2003], por lo que el estudio se llevó a cabo en NaOH 0.1 M. En estas condiciones, la hidrazina, que tiene un  $pK_a$  de 7.9 [Adams, 1963], se encuentra desprotonada, por tanto, la oxidación sucede de acuerdo con la reacción:



En los voltamperogramas de la figura 3.18 se puede observar que, en ausencia de hidrazina (—), la respuesta del electrodo modificado muestra el par redox característico del 3,4-DHS. La adición de hidrazina (—) provoca un drástico incremento de la corriente anódica, además de una disminución en la corriente catódica, lo que es característico de un potente efecto electrocatalítico. Además, el pico de oxidación de la hidrazina aparece a un potencial de -0.2 V, correspondiente a la señal del 3,4-DHS. Este valor es mucho más bajo que el que se obtiene al oxidar esta molécula en un electrodo sin modificar (figura 3.19A) o modificada con 3,4-DHS (figura 3.19B), para los que no se observa el pico de oxidación en el intervalo de potencial estudiado.

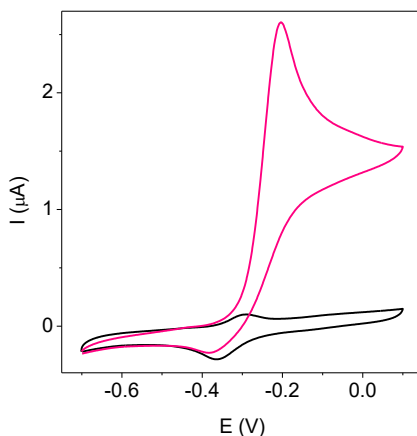


Fig. 3.18. Voltamperogramas cíclicos de CSPE/AuNPs-DHS en ausencia (—) y en presencia de hidrazina 60  $\mu$ M (—) en NaOH 0.1 M a 10  $mV s^{-1}$ .

En este último caso, la ausencia de onda de oxidación puede ser debida a que en el medio básico fuerte en el que se está trabajando el 3,4-DHS puede desprenderse de la superficie del electrodo, por lo que el electrodo se comportaría como un electrodo no modificado. En las AuNPs-DHS el 3,4-DHS se encuentra fuertemente unido, como se demostró en los estudios anteriores y, por tanto, permanece unido aun en medio muy básico.

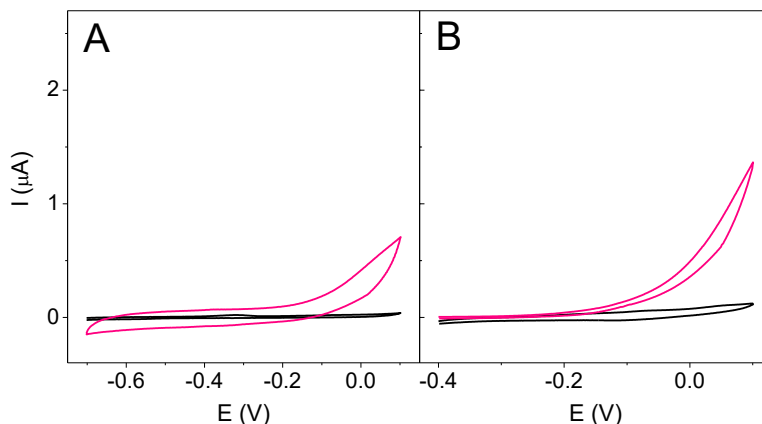


Fig. 3.19. Voltamperogramas cíclicos de CSPEs (A) no modificado y (B) modificado con 3,4-DHS en ausencia (—) y en presencia de hidrazina 1 mM (—) en NaOH 0.1 M a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Los resultados obtenidos confirman que la nanoestructuración de CSPEs con AuNPs-DHS da lugar a plataformas con una buena actividad electrocatalítica para la oxidación de hidrazina.

#### 3.3.2.1 Efecto del pH en la oxidación catalítica de hidrazina

El hecho de que en la reacción de oxidación, tanto de la hidrazina como del 3,4-DHS haya protones involucrados, hace que sea necesario optimizar el valor de pH al que se lleva a cabo la determinación. Para ello, se estudió la respuesta voltamperométrica de los CSPEs nanoestructurados con AuNPs-DHS frente a disoluciones de hidrazina 1.0 mM a diferentes valores de pH. En la figura 3.20 se muestran los barridos anódicos para mayor claridad.

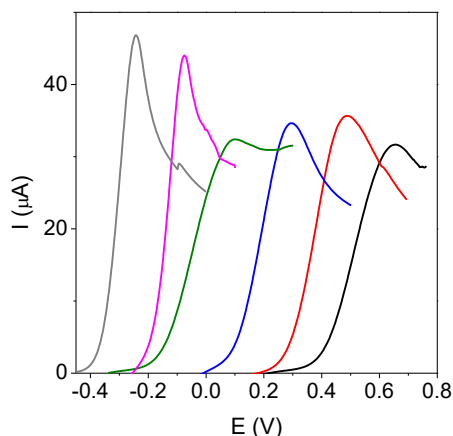


Fig. 3.20. Barridos anódicos de CSPEs/AuNPs-DHS en presencia de 1.0 mM de hidrazina a diferentes valores de pH: 3.0 (—), 5.0 (—), 7.0 (—), 9.0 (—), 11.2 (—) y 13.0 (—) a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Se puede observar que la mayor intensidad se obtiene para pH 13.0, por lo que se utilizará este pH para el desarrollo del sensor de hidrazina.

### 3.3.2.2 Efecto de la velocidad de barrido en la oxidación catalítica de hidrazina

Para analizar el proceso catalítico y determinar el mecanismo por el que transcurre la electrooxidación de hidrazina, se estudió la respuesta de los electrodos nanoestructurados con AuNPs-DHS en función de la velocidad de barrido.

En la figura 3.21A se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes a la oxidación electrocatalítica de hidrazina 1.0 mM en NaOH 0.1 M sobre los CSPEs/AuNPs-DHS a diferentes velocidades de barrido ( $v$ ). Se puede observar un desplazamiento del pico anódico hacia potenciales más altos a medida que aumenta  $v$ , lo que sugiere la existencia de limitaciones cinéticas en la transferencia de carga. La relación lineal observada en la representación de la intensidad de pico catalítico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (figura 3.21B) indica que el proceso catalítico está limitado por la difusión de la hidrazina hacia la superficie del electrodo.

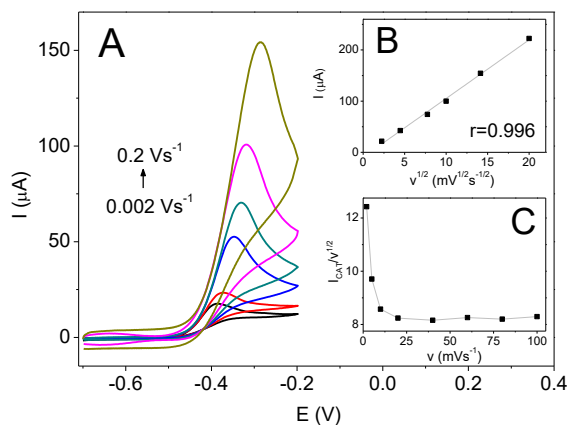


Fig. 3.21. (A) Voltamperogramas cíclicos de la oxidación de hidrazina 1.0 mM en NaOH 0.1 M sobre CSPEs/AuNPs-DHS a diferentes velocidades de barrido. (B) Representación de la corriente catalítica en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. (C) Representación de la corriente catalítica normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad en función de la velocidad de barrido.

Al representar la corriente normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido frente a la velocidad de barrido (figura 3.21C) se obtiene la típica curva de un mecanismo EC catalítico [Nicholson, 1964], al igual que en el caso de rGO-DHS. Así, el mecanismo según el cual ocurre la oxidación electrocatalítica de hidrazina es el que se representa en el esquema de la figura 3.22, donde la reducción de las quinonas por parte de la hidrazina reinicia el ciclo catalítico.

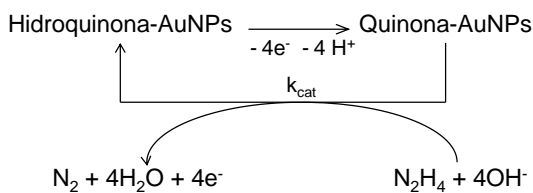


Fig. 3.22. Esquema del mecanismo catalítico de la oxidación de hidrazina sobre las plataformas AuNPs-DHS.

### 3.3.2.3 Determinación de la constante catalítica para hidrazina

Se estimó la constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) para la reacción entre la hidrazina y los electrodos nanoestructurados utilizando cronoamperometría de un solo pulso siguiendo el método de Galus [Galus, 1991], según se describe en materiales y métodos. Al representar  $I_{\text{CAT}}/I_D$  frente a la raíz cuadrada del tiempo de medida para distintas concentraciones de hidrazina (figura 3.23) se obtienen líneas rectas. De la representación de las pendientes de las rectas frente la raíz cuadrada de la concentración (fig. 3.23 inserto) se calcula la constante catalítica. En este caso, se obtuvo un valor de  $6.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor de la constante es varios órdenes de magnitud mayor que los que se encuentran en la bibliografía para otros sensores de hidrazina basados en electrodos modificados [Nassef, 2006; Ozoemena, 2006; Foster, 2014; Sun, 2013; Tan, 2013; Bravo, 2015] y es también superior a los obtenidos para las plataformas desarrolladas por nanoestructuración de CSPEs mediante diazotación y electroinjerto de nanotubos de carbono aminados en combinación con 3,4-DHS ( $2.93 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) o por nanoestructuración de CSPEs con rGO-DHS ( $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), demostrando así la extraordinaria eficiencia catalítica de estos electrodos modificados promovida por las nanoestructuras AuNPs-DHS.

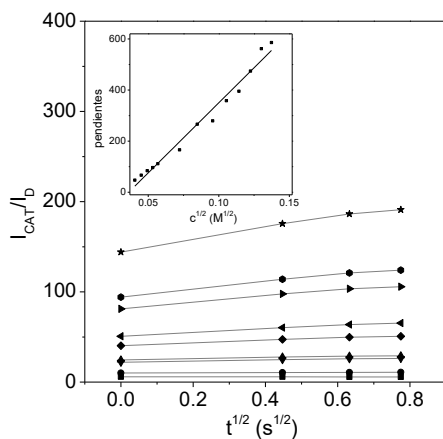


Fig. 3.23. Representación de  $I_{\text{CAT}}/I_D$  frente a  $t^{1/2}$  para hidrazina sobre CSPEs/AuNPs-DHS. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

### 3.3.2.4 Propiedades analíticas del sensor de hidrazina

Para determinar las propiedades del sensor de hidrazina, se llevaron a cabo experimentos cronoamperométricos pulsando el potencial desde -0.60 V hasta 0.0 V en disolución no agitada (figura 3.24). La corriente de estado estacionario se alcanza en pocos segundos, lo que confirma la rápida respuesta del sensor. Dicha corriente muestra una relación lineal ( $y=2.13 \times 10^{-2}x - 1.39$ ,  $R^2= 0.996$ ) con la concentración de hidrazina hasta 4.0 mM (figura 3.24 inserto).

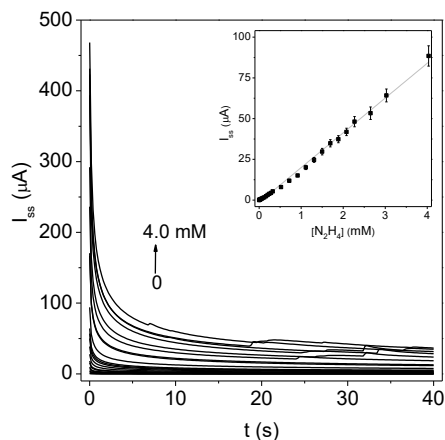


Fig. 3.24. Cronoamperogramas de la oxidación de hidrazina sobre CSPEs/AuNPs-DHS a pH 13.0. Inserto: Corriente en el estado estacionario ( $I_{ss}$ ) a 38 segundos frente a la concentración de hidrazina.

La sensibilidad, determinada por la pendiente de esta recta, es  $(2.13 \pm 0.03) \times 10^{-2} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación, calculados como las concentraciones de hidrazina que generan una señal igual a tres o diez veces la desviación estándar de la corriente del blanco, se estimaron en 22 y 70 nM, respectivamente, como se recoge en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros analíticos obtenidos para la oxidación electrocatalítica de hidrazina sobre CSPEs nanoestructurados con AuNPs-DHS.

Límite de detección (nM)	Límite de cuantificación (nM)	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)	Estabilidad
22	70	hasta 4	$2.13 \times 10^{-2}$	4.9	6 semanas

Este límite de detección es inferior al encontrado en la bibliografía para sensores de hidrazina basados en electrodos modificados con moléculas electroactivas y nanopartículas de oro. Algunos ejemplos son el trabajo de Saengsookwaow [Saengsookwaow, 2016], donde se describe un sensor de hidrazina basado en la modificación de un electrodo serigrafado de carbono con un compuesto de grafeno dopado con nitrógeno y polivinilpirrolidona y AuNPs electrodepositadas, en el que se alcanza un límite de detección de 70 nM, o los de Koçak, donde se describen sensores de hidrazina basados en la modificación de un electrodo de carbón vítreo con taurina electropolimerizada y AuNPs electrorreducidas [Koçak, 2016] o en la modificación de un electrodo de carbón vítreo con nanotubos de carbono, púrpura de bromocresol electropolimerizado y AuNPs electrorreducidas [Koçak, 2014], alcanzándose límites de detección de 50 y 100 nM, respectivamente.

Se evaluó la reproducibilidad a partir de la R.S.D. de la respuesta de tres electrodos distintos. En este caso, para una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , se obtuvo una R.S.D. de 4.9 %, inferior al valor de  $\text{CV}_H$  de 10.2  $\text{CV}_H$  calculado para esa concentración [Wood, 1999], confirmando la buena reproducibilidad del sensor desarrollado.

Para evaluar la estabilidad de este sensor se estudió su respuesta en presencia de hidrazina 1.0 mM tras 6 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente, observándose que se mantenía constante durante ese tiempo.

Si se compara este sensor de hidrazina con los otros descritos en esta memoria basados en la nanoestructuración de CSPEs, bien mediante diazotación y electroinjerto de MWCNTs y posterior modificación con 3,4-DHS o por adsorción directa de rGO-DHS se observa que la nanoestructuración con AuNPs-DHS permite conseguir el límite de detección más bajo, con un intervalo lineal más amplio y una mayor sensibilidad (tabla 3.4).



Tabla 3.4. Comparación de los parámetros analíticos obtenidos para la oxidación electrocatalítica de hidrazina para CSPEs nanoestructurados con diferentes nanomateriales.

Modificación	Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )
MWCNTs + 3,4-DHS	6.0	0.01-2.0	$1.9 \times 10^{-2}$
rGO-DHS	0.20	hasta 1.5	$2.07 \times 10^{-2}$
AuNPs-DHS	0.022	hasta 4.0	$2.13 \times 10^{-2}$

### 3.3.3 Oxidación electrocatalítica de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es un líquido incoloro a temperatura ambiente, de olor penetrante y soluble en agua. Aunque presenta unas propiedades físicas similares al agua, químicamente se diferencian en que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se comporta como un ácido débil debido a la presencia del segundo átomo de oxígeno.

Entre sus aplicaciones destaca su uso como blanqueante industrial de papel, madera o textiles, aunque también se utiliza para el blanqueo de alimentos y como blanqueante dental. También se emplea como agente bacteriostático, ya que altera la conformación de las enzimas bacterianas, y desinfectante, debido al desprendimiento de oxígeno provocado por la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por las enzimas catalasas presentes en las células.

A nivel biológico, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un subproducto de la reacción enzimática catalizada por las enzimas oxidasas, por lo que su determinación es de gran importancia en el desarrollo de biosensores basados en este tipo de enzimas, ya que su concentración es directamente proporcional a la cantidad de sustrato transformado por la enzima.

Otra característica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es que puede actuar como agente oxidante o como reductor tanto en medio ácido como básico. [Harris, 2007]. Concretamente, la oxidación electrocatalítica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio básico es una reacción de gran interés en el desarrollo de futuras celdas de combustible [Yamada, 2010].

Típicamente, el oro policristalino presenta una pobre actividad catalítica frente a la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tanto en medio ácido como básico. Sin embargo, las AuNPs

muestran interesantes propiedades electrocatalíticas, como se ha comentado anteriormente, frente a la reducción de oxígeno [Hernández, 2005; Shim, 2011] o a la oxidación de peróxido de hidrógeno [Das, 2008]. Por este motivo se estudió la capacidad de las AuNPs-DHS sintetizadas para actuar como catalizador en la oxidación y reducción de peróxido de hidrógeno.

En la figura 3.25 (—) se muestra el voltamperograma cíclico de un CPSE nanoestructurado con AuNPs-DHS en una disolución de NaOH 0.1 M en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5.0 mM. En el voltamperograma se puede ver un pico catódico bien definido a -0.25 V y otro anódico a 0.04 V, a diferencia del electrodo no modificado (figura 3.25 —), para el que, en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no se observa ningún pico de oxidación o reducción.

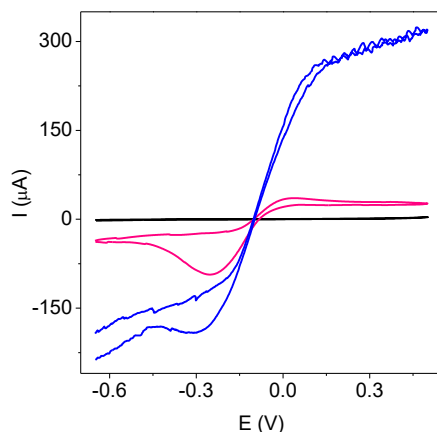


Fig. 3.25. Voltamperogramas cíclicos de CPSEs/AuNPs-DHS en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5.0 mM (—) y 22.0 mM (—) y CPSE no modificado en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5.0 mM (—) en NaOH 0.1 M a velocidad  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

El proceso anódico observado corresponde a la oxidación electroquímica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$ . El pico catódico se puede asignar a la reducción de oxígeno, producido por la descomposición catalítica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en contacto con electrodos de oro [Miah, 2006; Merkulova, 1973; Goszner, 1974; McKee, 1969; Bianchi, 1962; Ishtchenko, 2003].

Tanto el pico de oxidación como el de reducción aumentan al aumentar la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se observa además que la curva adquiere una forma

sigmoideal, lo que significa que la velocidad de transferencia electrónica es muy elevada y el proceso está controlado por la difusión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hacia el electrodo, alcanzándose una corriente límite de difusión (figura 3.25 —). En estas condiciones, en ausencia de agitación, la aparición de esta corriente límite de difusión, característica de una difusión hemiesférica en lugar de una planar, se explicaría considerando el electrodo modificado con las AuNPs como un conjunto de “nanoelectrodos” esféricos [Murray, 2008; Arrigan, 2004].

### 3.3.3.1 Efecto del pH en la oxidación catalítica de peróxido de hidrógeno

Al igual que en el caso de la oxidación de hidrazina, en la reacción de oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hay protones involucrados, por lo que se estudió la influencia del pH. En la figura 3.26 se muestran los barridos anódicos de la respuesta voltamperométrica de los CSPEs nanoestructurados con AuNPs-DHS en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.0 mM a diferentes valores de pH.

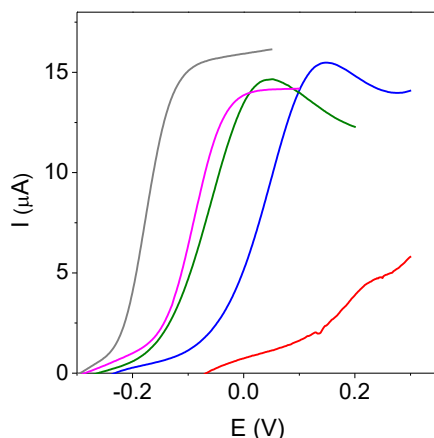


Fig. 3.26. (A) Barridos anódicos de CSPEs/AuNPs-DHS en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.0 mM a diferentes valores de pH: 5.0 (—), 7.0 (—), 9.0 (—), 11.2 (—) y 13.0 (—) a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Variación de la corriente electrocatalítica en función del pH.

En este caso se observan dos máximos de intensidad, a pH 7.0 (—) y pH 13.0 (—). Teniendo en cuenta otros sensores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  descritos en la bibliografía donde la

detección se realiza en medio básico [Miah, 2006; Yang, 2012b], se eligió pH 13.0 como pH de trabajo en el desarrollo del sensor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.3.3.2 Efecto de la velocidad de barrido en la oxidación catalítica de peróxido de hidrógeno

Como en el caso de la hidrazina, para elucidar el mecanismo, se estudió el efecto de la velocidad de barrido en la electrooxidación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante voltamperometría cíclica.

En las figura 3.27A se puede observar que la intensidad de pico catalítico presenta una relación lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, lo que indica que es un proceso controlado por difusión, es decir, la difusión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  hacia la superficie del electrodo.

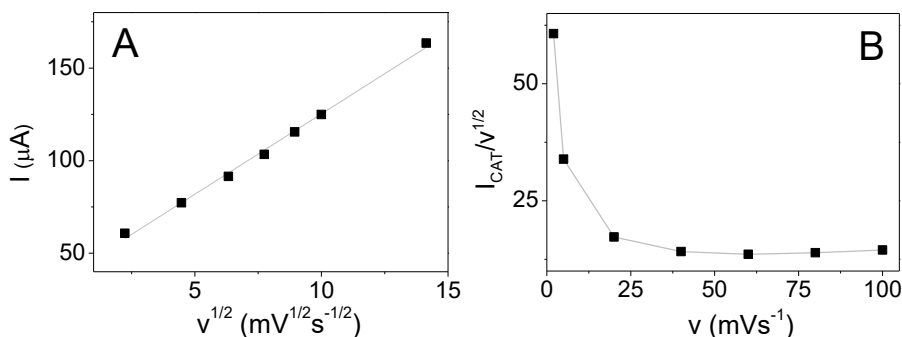


Fig. 3.27. (A) Representación de la corriente catalítica en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  3.0 mM en NaOH 0.1 M sobre CSPEs/AuNPs-DHS a diferentes velocidades de barrido. (B) Representación de la corriente catalítica normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad en función de la velocidad de barrido.

Además, la curva obtenida de la representación de la corriente normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido frente a la velocidad de barrido (figura 3.27B) indica que el mecanismo a través del que transcurre la reacción es de tipo EC catalítico [Nicholson, 1964], en el que la reacción de oxidación está mediada por las nanopartículas de oro recubiertas con 3,4-DHS.

### 3.3.3.3 Determinación de la constante catalítica para peróxido de hidrógeno

Se calcularon las constantes catalíticas para las reacciones de oxidación y reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante medidas cronoamperométricas de un solo pulso aplicando potenciales desde  $-0.6\text{ V}$  hasta  $+0.3\text{ V}$  y  $-0.3\text{ V}$  para la electrooxidación y electrorreducción, respectivamente, siguiendo el procedimiento descrito por Galus [Galus, 1991], de la misma manera que se hizo en el caso de la hidrazina.

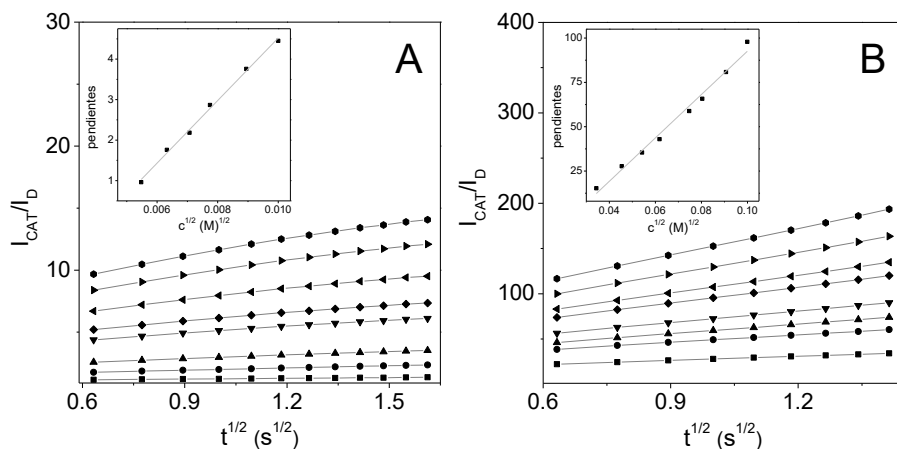


Fig. 3.28. Representación de  $I_{\text{CAT}}/I_{\text{D}}$  frente a  $t^{1/2}$  para (A) la oxidación y (B) la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre CSPEs/AuNPs-DHS. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

En las figuras 3.28A y B se muestran las representaciones de la relación  $I_{\text{CAT}}/I_{\text{D}}$  obtenidas para la oxidación y reducción de distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivamente. A partir de la pendiente obtenida de la representación de las pendientes de estas rectas frente a la raíz cuadrada del tiempo se obtuvieron los valores de la constante catalítica, en este caso,  $1.9 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$  para la oxidación y  $5.1 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$  para la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Estos valores son varios órdenes de magnitud superiores a los valores de  $k_{\text{cat}}$  descritos para otros sistemas electrocatalíticos para la reducción u oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Iveković, 2010; Ojani, 2010]. Esto indica que las AuNPs sintetizadas presentan una fuerte actividad electrocatalítica tanto frente a la oxidación, como a la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.3.3.4 Propiedades analíticas del sensor de peróxido de hidrógeno

Se ha observado previamente (figura 3.25) que las corrientes de pico anódica y catódica aumentan al aumentar la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por lo que las plataformas nanoestructuradas desarrolladas pueden ser empleadas como sensores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  midiendo su oxidación o reducción. Para determinar las propiedades analíticas del sensor se realizaron medidas cronoamperométricas frente a concentraciones crecientes de analito.

En el caso de la oxidación, se aplicó un potencial de +0.3 V y los cronoamperogramas obtenidos se muestran en la figura 3.29A. En la representación de la corriente en estado estacionario a 38 s frente a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figura 3.29A inserto) se observa una relación lineal ( $y=9.24 \times 10^{-3}x + 2.23 \times 10^{-2}$ ,  $R^2= 0.998$ ) hasta 14 mM. La sensibilidad obtenida fue  $(9.24 \pm 0.03) \times 10^{-3} \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$  y los límites de detección y cuantificación, calculados con el criterio de 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, se estimaron en 0.15 y 0.51  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

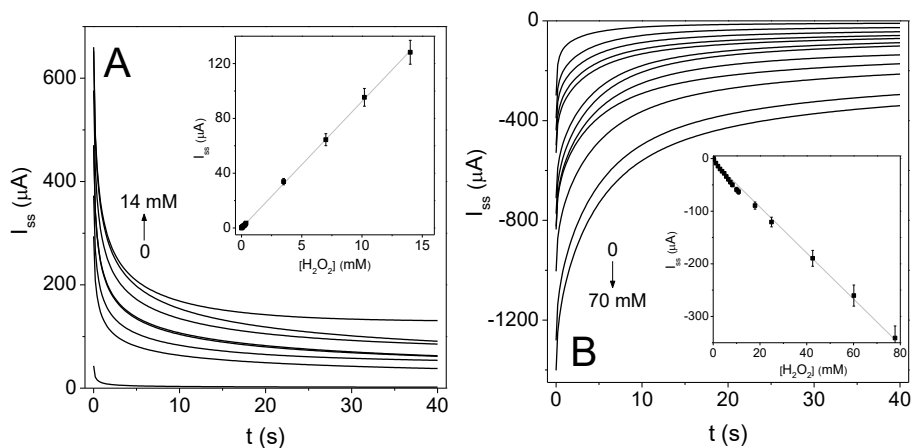


Fig. 3.29. Cronoamperogramas de (A) oxidación y (B) reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre CSPes/AuNPs-DHS a pH 13.0. Inserto: Corriente en el estado estacionario ( $I_{ss}$ ) a 38 segundos frente a la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para el proceso de electrorreducción a -0.3 V (figura 3.29B), se observa que los electrodos nanoestructurados presentan una buena respuesta frente a la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , con un amplio intervalo lineal ( $y=-6.03 \times 10^{-3}x - 6.95 \times 10^{-1}$ ,  $R^2= 0.996$ ) hasta 70

mM y una sensibilidad de  $(-6.03 \pm 0.05) \times 10^{-3} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ . Además, se obtuvieron bajos límites de detección, 0.32  $\mu\text{M}$ , y cuantificación, 1.1  $\mu\text{M}$ . Los parámetros analíticos obtenidos para ambos procesos se recogen en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Parámetros analíticos obtenidos para la oxidación y reducción electrocatalíticas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre CSPEs nanoestructurados con AuNPs-DHS.

	Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)
oxidación	0.15	0.51	hasta 14	$9.24 \times 10^{-3}$	6.8
reducción	0.32	1.1	hasta 70	$-6.03 \times 10^{-3}$	8.2

Estos datos se comparan favorablemente con otros sensores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  basados en electrodos modificados descritos en la bibliografía [Iveković, 2010; Ojani, 2010; Qin, 2015; Cao, 2015; Lian, 2009; Welch, 2005; Liu, 2009b; Iveković, 2012; Dutta, 2012; Salimi, 2011; Chang, 2014; Xiong, 2014]. En concreto, se obtienen mejores límites de detección y cuantificación que en el caso de electrodos modificados con compósitos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Fe}_2\text{O}_3$  [Cao, 2015], plata rugosada [Lian, 2009] o nanopartículas de plata [Welch, 2005]. En el caso de electrodos modificados con reactivos químicos como azul de Prusia [Liu, 2009b; Iveković, 2012; Dutta, 2012] o con un complejo de Mn-fenazina [Salimi, 2011] los límites de detección son similares a los obtenidos con las plataformas AuNPs-DHS desarrolladas, pero, en general, con los electrodos nanoestructurados con AuNPs-DHS se obtienen intervalos lineales más amplios [Chang, 2014], y requieren la aplicación de potenciales más bajos [Xiong, 2014], con la ventaja de que se pueden utilizar para detectar  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tanto por electrooxidación como por electrorreducción.

### 3.4 Desarrollo de un biosensor de lactato

Al igual que en el capítulo anterior, para el desarrollo del biosensor se utilizó la enzima lactato oxidasa. En este capítulo, aprovechando las excelentes propiedades catalíticas frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  de las plataformas desarrolladas, se ha continuado con la misma enzima para desarrollar un sensor amperométrico de lactato basado en la

detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado en la reacción enzimática sobre CSPEs nanoestructurados con AuNPs-DHS.

### 3.4.1 Desarrollo y respuesta del biosensor

El biosensor de lactato se preparó mediante modificación de las plataformas nanoestructuradas con AuNPs-DHS con 1.0 U de LOx, como se muestra en el esquema de la figura 3.30.

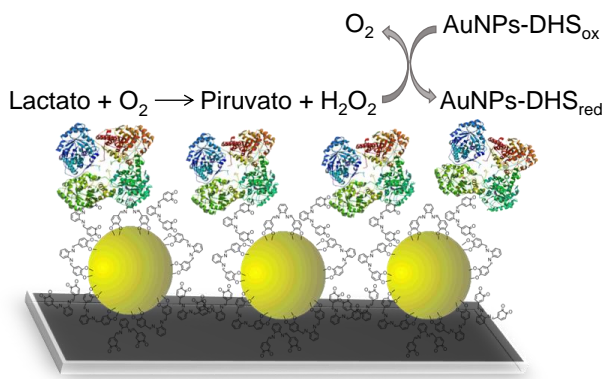


Fig. 3.30. Esquema de funcionamiento del biosensor basado en CSPE/AuNPs-DHS y LOx.

La actividad catalítica del biosensor desarrollado se evaluó mediante voltamperometría cíclica en ausencia y en presencia del sustrato natural (lactato). En la figura 3.31 se puede apreciar que en ausencia de lactato (—), se observa la respuesta electroquímica adscrita a la oxidación/reducción de los grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHS que recubre las AuNPs. Cuando se adiciona lactato en concentración 0.5 mM (—) se aprecia un aumento en la corriente anódica debido a la oxidación electrocatalítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado en la reacción enzimática. Además, se observa una disminución en la corriente catódica, de acuerdo con un proceso electrocatalítico, que comprende una serie de reacciones en cascada, tal y como se recoge en el esquema de la figura 3.30.



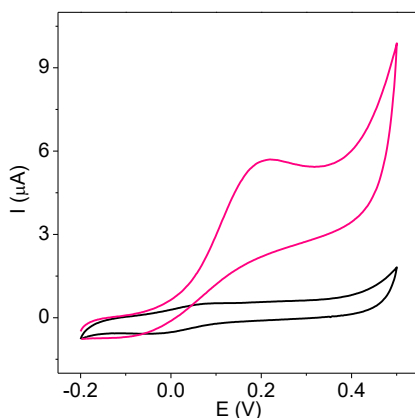


Fig. 3.31. Voltamperogramas cíclicos de CSPEs/AuNPs-DHS modificados con LOx en ausencia (—) y en presencia (—) de lactato 0.5 mM tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Según este esquema, en el funcionamiento del biosensor los electrones involucrados en la reacción se transfieren desde el sustrato (lactato) a la forma oxidada del cofactor de la enzima (flavín mononucleótido, FMN) presente en la estructura de la enzima. Para regenerar el sitio catalítico de la enzima, el oxígeno molecular toma los electrones del cofactor reducido, transformándose en peróxido de hidrógeno. El peróxido, a su vez, se reduce a oxígeno, cediendo electrones al mediador, en este caso, las nanoestructuras AuNPs-DHS, cuya oxidación produce la señal electroquímica.

En el estudio de la influencia del pH en la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figura 3.26) se observó que la respuesta de las plataformas nanoestructuradas obtenida en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  3.0 mM era máxima a pH 13.0, que se usó para el desarrollo del sensor, y a pH 7.0. Dado que el correcto funcionamiento de la enzima es a pH 7.0, en este caso, la respuesta del biosensor se obtuvo utilizando como medio de trabajo tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0.

Para confirmar el papel de la enzima en la respuesta catalítica al sustrato, se estudió la respuesta de los electrodos nanoestructurados con AuNPs-DHS sobre los que no se había inmovilizado la enzima LOx.

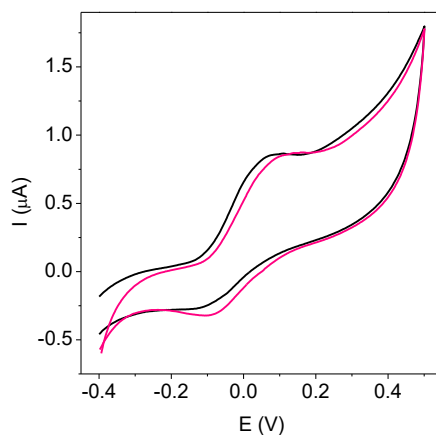


Fig. 3.32. Voltamperogramas cíclicos de CSPEs/AuNPs-DHS en ausencia (—) y en presencia (—) de lactato 0.5 mM tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 3.32 se puede apreciar que en presencia de lactato (—) no se observa un aumento de la corriente anódica al comparar con el voltamperograma obtenido en ausencia de lactato (—). Esto confirma que la respuesta del biosensor procede de la reacción enzimática.

#### 3.4.1.1 Efecto de la cantidad de AuNPs-DHS

Se espera que la respuesta del biosensor dependa significativamente de la cantidad de AuNPs-DHS depositadas sobre la superficie del electrodo. Por este motivo, se prepararon diferentes biosensores con concentraciones crecientes de AuNPs-DHS. En la figura 3.33 se muestran las respuestas de los biosensores preparados utilizando 20, 70 o 180 fmol de AuNPs-DHS en ausencia (—) y en presencia (—) de lactato 0.5 M.

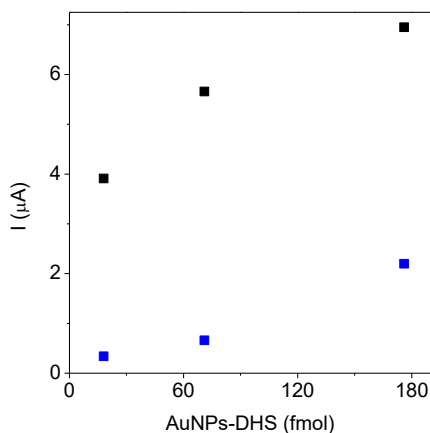


Fig. 3.33. Respuesta del biosensor preparado con diferentes cantidades de AuNPs en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en ausencia (—) y en presencia (—) de lactato 0.5 mM a  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

La mayor respuesta catalítica se obtuvo cuando se utilizaron 180 fmol. Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 3.33, para esa cantidad de AuNPs-DHS, la respuesta en ausencia de lactato también es muy elevada. La eficiencia catalítica, definida como la relación entre la corriente catalítica y la corriente medida para los electrodos modificados en ausencia de lactato, es mayor cuando se utilizan 70 fmol de AuNPs-DHS. Por tanto, se eligió esta cantidad para la preparación del biosensor en los siguientes estudios.

#### 3.4.1.2 Efecto de la cantidad de enzima

Se optimizó también la cantidad de enzima en el desarrollo del biosensor. Por este motivo, se prepararon diferentes biosensores con concentraciones crecientes de LOx. En la figura 3.34 se puede observar que la respuesta del biosensor aumenta al aumentar las unidades de enzima incluidas en la capa biosensora desde 0.3 U a 1 U.

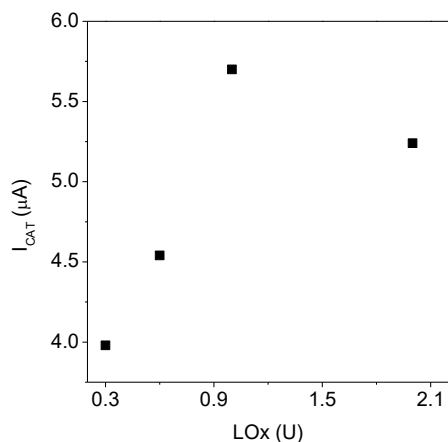


Fig. 3.34. Respuesta del biosensor preparado con diferentes cantidades de enzima LOx en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de lactato 0.5 mM a  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

A mayores cantidades de enzima, se produce una disminución en la respuesta del biosensor. Esto se debe probablemente a un exceso de proteína en la capa biosensora, que dificulta la transferencia de carga hacia la superficie del electrodo. De acuerdo con estos resultados, se eligió 1.0 U como la cantidad óptima de LOx.

#### 3.4.1.3 Efecto del pH

Se estudió el efecto del pH de la disolución en la respuesta del biosensor en el intervalo 5.0-8.0. Los resultados mostrados en la figura 3.35 revelan que la respuesta aumenta al aumentar el pH, alcanzando un máximo a pH 7.0 y a valores de pH superiores la intensidad disminuye.

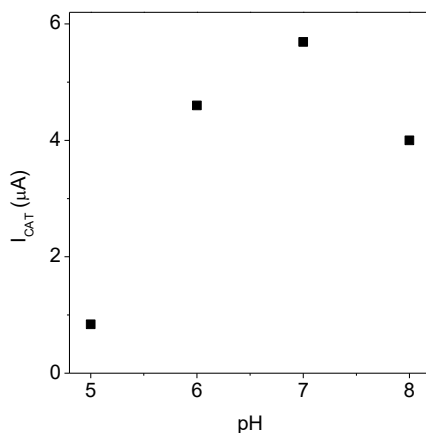


Fig. 3.35. Efecto del pH en la respuesta del biosensor en presencia de lactato 0.5 mM a  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Por este motivo, se eligió el tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 como medio de trabajo para la determinación de lactato.

### 3.4.2 Respuesta del biosensor

Una vez optimizadas las condiciones de trabajo, se estudió la respuesta del biosensor mediante cronoamperometría, aplicando un potencial constante de +0.3 V. La figura 3.36 muestra la respuesta en función de la concentración de lactato. Se observa que la curva de calibrado se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten. Esto confirma que la respuesta del biosensor está controlada por la reacción enzimática y que a una determinada concentración de sustrato la respuesta es independiente de esta.

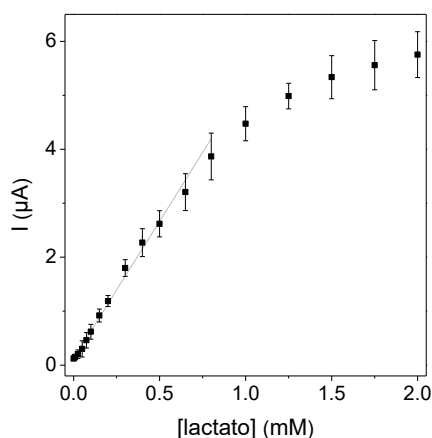


Fig. 3.36. Curva de calibrado obtenida de las medidas cronoamperométricas para CSPE/AuNPs-DHS modificado con LOx en presencia de concentraciones crecientes de lactato en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0.

Los parámetros analíticos del biosensor se obtuvieron de la parte lineal (hasta 800  $\mu\text{M}$ ) de la curva de calibrado. La sensibilidad obtenida, calculada a partir de la pendiente de la recta, fue de  $(5.1 \pm 0.1) \times 10^{-3} \mu\text{A mM}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación, calculados como la concentración que produce una señal igual a tres o diez veces la desviación estándar de la corriente del blanco, fueron 2.6 y 8.6  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Todos los parámetros se encuentran recogidos en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de lactato sobre CSPEs nanoestructurados con AuNPs-DHS y modificados con LOx.

Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{M}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)
2.6	8.6	< 800	$5.1 \times 10^{-3}$	8.6

El límite de detección es inferior al obtenido con las plataformas basadas en la nanoestructuración de CSPEs con rGO-DHS, desarrollado en el capítulo anterior. Además, se compara favorablemente con otros biosensores de lactato basados en la

modificación de electrodos serigrafados con LOx descritos previamente [Loaiza, 2015; Parra, 2006a].

La reproducibilidad se evaluó comparando las señales analíticas obtenidas usando tres biosensores diferentes preparados de la misma manera. Se obtuvo un valor de la desviación estándar relativa del 8.6% para la concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Este valor es inferior al  $\text{CV}_H$  calculado para esa concentración, de 10.2 [Wood, 1999], asegurando la buena reproducibilidad del biosensor desarrollado.

Finalmente, se examinó la estabilidad midiendo la respuesta de tres biosensores distintos frente a 0.5 mM de lactato durante un mes. Pasado este tiempo, los biosensores mantuvieron el 85% de su respuesta original.

### **3.4.3 Estudio de sustancias potencialmente interferentes**

La presencia en las muestras reales de sustancias que puedan interferir en la respuesta del biosensor hace que sea necesario evaluar el efecto que producen en dicha respuesta. Se estudió el efecto de las sustancias potencialmente interferentes comúnmente presentes en alimentos y bebidas, como son el ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acético, glucosa, fructosa, etanol y metanol. Al igual que en el capítulo anterior, se encontró que la presencia de estas sustancias no afecta de manera notable a la respuesta del biosensor de lactato desarrollado, excepto en el caso del ácido ascórbico cuando se encuentra en la misma concentración que el lactato, aunque no se observó ningún efecto a concentraciones más bajas. Estos resultados aseguran que el biosensor desarrollado es muy selectivo y se puede emplear satisfactoriamente en la determinación directa de lactato en muestras reales sin la necesidad de realizar ningún paso previo de tratamiento de las mismas.

### **3.4.4 Determinación directa de lactato en muestras reales**

El biosensor desarrollado puede ser empleado como método analítico rápido y sencillo en la determinación directa de lactato en procesos de control alimentario. Por este motivo, se aplicó en la determinación de lactato en distintos alimentos o bebidas, en concreto, vino blanco, cerveza y yogur.

El único tratamiento de la muestra para llevar a cabo la determinación de lactato fue la dilución en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 (25  $\mu$ L de vino, 40  $\mu$ L de cerveza o 10  $\mu$ L de yogur) hasta 10 mL con el propósito de que la concentración de analito esté comprendida en el intervalo lineal de la recta de calibrado (hasta 800  $\mu$ M). Para minimizar los efectos de la matriz se utilizó el método de adición estándar. La determinación se llevó a cabo utilizando cronoamperometría a +0.3 V. Los resultados obtenidos, expresados como el valor medio de tres determinaciones utilizando diferentes biosensores, se muestran en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Determinación de lactato en diferentes muestras con el biosensor desarrollado y con un kit enzimático comercial.

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de lactato (g/L) (biosensor LOx)</b>	<b>Contenido de lactato (g/L) (kit comercial)</b>
Vino blanco	1.7 $\pm$ 0.1	1.73 $\pm$ 0.02
Cerveza	0.10 $\pm$ 0.02	0.100 $\pm$ 0.001
Yogur	5.4 $\pm$ 0.6	5.7 $\pm$ 0.4

Estos resultados se compararon con los obtenidos utilizando un kit enzimático comercial basado en L-lactato deshidrogenasa/glutamato-piruvato transaminasa y detección espectrofotométrica a 340 nm del NADH formado durante la reacción enzimática, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. Los resultados obtenidos mediante el kit enzimático se encuentran resumidos en la tabla 3.7. Como se puede observar, la concentración media de lactato obtenida utilizando el biosensor concuerda con la obtenida utilizando el kit enzimático comercial, con la ventaja de que el procedimiento experimental es más rápido, directo y económico cuando se utiliza el biosensor.





## Capítulo 4

---



## 4. Nanopuntos de carbono para la detección de mutaciones genéticas

---

En este capítulo se ha estudiado la utilización de un nuevo nanomaterial de carbono, los nanopuntos de carbono, para mejorar las propiedades de los biosensores. Este nanomaterial se ha utilizado para la nanoestructuración de electrodos con el objetivo de desarrollar un biosensor de ADN sensible y selectivo. Los nanopuntos de carbono son un miembro reciente de la familia de los nanomateriales de carbono, con un tamaño inferior a 10 nm y baja toxicidad, lo que los hace muy atractivos para el estudio de sistemas biológicos. Tienen la ventaja de que se pueden sintetizar de manera sencilla a partir de diferentes fuentes de carbono para obtener nanopartículas funcionalizadas con diferentes grupos.

La modificación de electrodos de oro con este material permite la inmovilización de sondas de ADN no modificadas de manera que mantienen su capacidad de reconocimiento e hibridación con la secuencia analito.

En este capítulo se describe el desarrollo de un biosensor electroquímico de ADN capaz de detectar mutaciones genéticas en secuencias de más de 300 bases utilizando safranina como indicador del evento de hibridación.

### 4.1 Síntesis y caracterización de los nanopuntos de carbono

La síntesis de los nanotubos de carbono (CDs) se llevó a cabo mediante carbonización térmica de dos moléculas orgánicas sencillas, como se muestra en la figura 4.1, según el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. En muchos métodos de síntesis de CDs es necesaria una etapa de pasivación de la superficie para obtener los grupos superficiales deseados [Peng, 2009; Sun, 2006], sin embargo, en este caso, la síntesis de los CDs y la pasivación de la superficie se llevan a cabo en un solo paso. Como fuente de carbono se utilizó el ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) y como agente pasivador de la

superficie, el tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Tras el proceso de purificación mediante diálisis, se obtuvo una dispersión de color amarillo anaranjado.

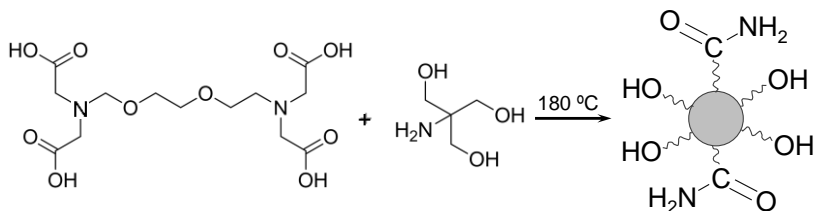


Fig. 4.1. Reacción de síntesis de los nanopuntos de carbono.

#### 4.1.1 Caracterización mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Se utilizó la espectroscopía FTIR para investigar los grupos funcionales presentes en los CDs. A modo de comparación, se registraron también los espectros de sus precursores: Tris y EGTA. Los espectros FTIR de los tres compuestos se muestran en la figura 4.2.

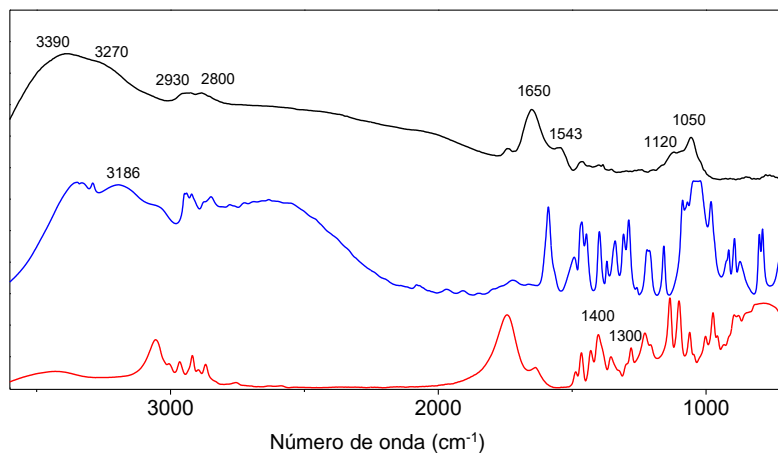


Fig. 4.2. Espectro FTIR de los nanopuntos sintetizados (—) y sus precursores, EGTA (—) y Tris (—).

En el espectro de los CDs (—) las bandas a 2800-2930  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a las vibraciones de tensión C-H y las bandas a 1050-1120  $\text{cm}^{-1}$ , a la tensión C-OH. Se

observan, además, las bandas de tensión C=O a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y de N-H a  $1543\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas anchas observadas a  $3390$  y  $3270\text{ cm}^{-1}$  se asignan a la tensión de los grupos -OH y -NH, respectivamente. Esta banda de -NH aparece desplazada con respecto a la banda correspondiente a la tensión del grupo -NH<sub>2</sub> en el espectro del Tris (—), donde aparece a  $3186\text{ cm}^{-1}$ . Esto indica que en los CDs ese grupo está unido a un grupo funcional distinto, lo que sugiere que forma parte de un grupo amida. Por otro lado, en el espectro de los CDs no se observan las bandas entre  $1300$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  que aparecen en el espectro del EGTA (—) y corresponden a las tensiones simétrica y asimétrica del grupo carboxilato, confirmando la ausencia de este grupo en la superficie de los CDs. La asignación de las bandas presentes en el espectro de los CDs se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Modos vibracionales presentes en el espectro FTIR de los CDs.

banda IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	modo vibracional
1050-1120	C-O
1543	$\delta$ N-H
1650	C=O
2800-2930	C-H
3270	N-H
3390	O-H

Estos resultados indican que los CDs se encuentran rodeados de grupos -OH y -CONH<sub>2</sub>, como se muestra en la figura 4.1. La presencia de estos grupos funcionales explica la buena solubilidad de los CDs en agua.

#### 4.1.2 Caracterización mediante dispersión de luz dinámica (DLS)

El tamaño de los CDs se determinó mediante análisis por dispersión de la luz dinámica (DLS). DLS es una técnica que permite obtener un perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas en suspensión. Se basa en la dispersión, en un determinado ángulo, de un haz de luz monocromática al incidir sobre una muestra [Berne, 1976].

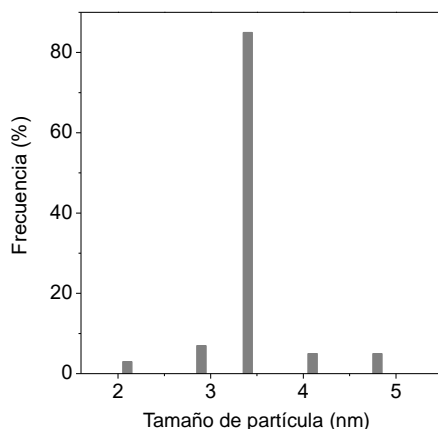


Fig. 4.3. Distribución de tamaño de los nanopuntos sintetizados obtenida mediante DLS.

En la figura 4.3 se muestra el histograma de distribución de tamaños de los CDs sintetizados. Se obtuvo una distribución de tamaños entre 2 y 5 nm. Se puede observar que las nanopartículas obtenidas son monodispersas, con un diámetro medio de  $3.4 \pm 0.5$  nm.

#### 4.1.3 Caracterización mediante análisis elemental

La composición de los CDs se estudió mediante análisis elemental. Los resultados obtenidos indican que los CDs están compuestos por carbono en un 55.10%, nitrógeno en un 0.29% e hidrógeno en un 10.17%, mientras que el 34.44% restante corresponde a oxígeno. Los nanopuntos de carbono también se llaman nanopuntos carbogénicos debido al alto contenido en oxígeno que presentan comparado con los nanodiamantes, que generalmente están formados por carbono en un 98% [Bourlinos, 2008; Liu, 2011b].

Los datos del análisis elemental se utilizaron para estimar la concentración de los CDs en la dispersión. Para ello, además de la composición, se tuvieron en cuenta la masa inicial de los reactivos y el tamaño obtenido para los CDs. De esta manera, según se describe en la sección de materiales y métodos, la concentración de los CDs en la dispersión se estimó en 277  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.4 Caracterización mediante potencial Zeta

El potencial zeta es un parámetro importante relacionado con la estabilidad o agregación en una dispersión. Este potencial es una medida de la carga superficial de las partículas en una dispersión y puede tener implicaciones importantes en el comportamiento del producto, ya que es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostáticas o de carga entre partículas. Así, un valor absoluto elevado del potencial zeta indica una alta repulsión entre las partículas, lo que las mantiene en suspensión, mientras que un valor bajo significa que no hay fuerzas entre ellas y es probable que se agreguen. El potencial zeta obtenido fue de  $-26 \pm 0.3$  mV (figura 4.4 —), debido a la presencia de grupos  $-OH$  y  $-CONH_2$ . Esta carga negativa contribuye a su buena dispersión en agua y confirma su estabilidad [Huang, 2012; Müller, 2001]. De hecho, el potencial zeta disminuye hasta  $-8.1 \pm 0.2$  mV tras 12 meses de almacenamiento, lo que confirma su poca tendencia a la agregación (figura 4.4 —).

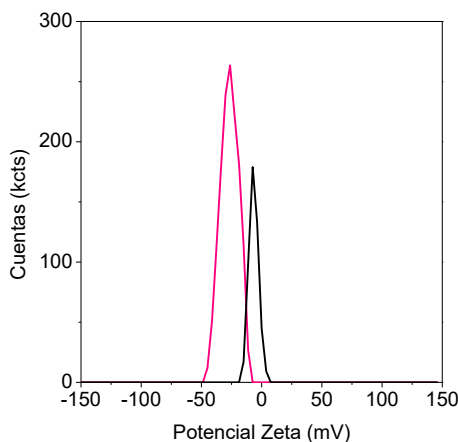


Fig. 4.4. Potencial Zeta de los nanopuntos tras la síntesis (—) y tras 12 meses (—).

#### 4.1.5 Caracterización mediante TEM

Se realizó también una caracterización morfológica de los CDs mediante TEM y las imágenes obtenidas se muestran en la figura 4.5. Se puede observar que los CDs son en su mayoría esféricos. A partir de estas imágenes se estimó su tamaño. De la medida de 20 nanopuntos, se estimó un tamaño medio de 3.5 nm.



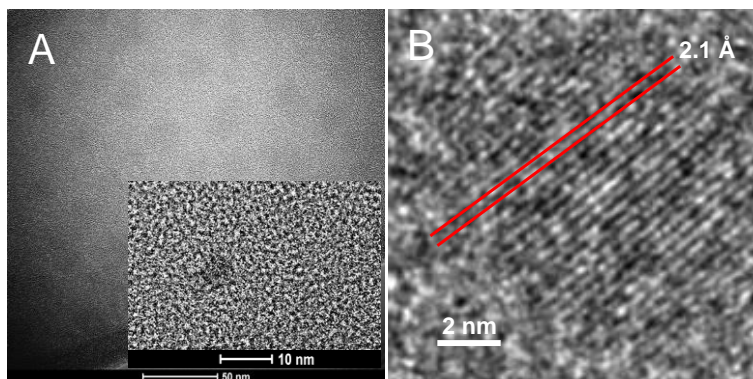


Fig. 4.5. Imágenes de TEM de los nanopuntos sintetizados.

La microscopía electrónica de transmisión también permitió obtener información sobre la estructura cristalina de los CDs, ya que esta técnica se basa en la detección de los electrones que atraviesan una muestra delgada al hacer incidir un haz de electrones sobre ella. Al atravesar la muestra, estos electrones pueden ser difractados. Si la muestra es cristalina, la difracción se producirá de acuerdo a la estructura cristalina, formando un patrón de difracción. El análisis por transformada rápida de Fourier (FFT) de las imágenes de TEM obtenidas en formato digital, permitió obtener el patrón de difracción de los electrones al atravesar la muestra y, a partir de él, se estimó el espaciado interplanar de la red cristalina. El análisis por FFT de la imagen 4.5B dio como resultado un valor de 2.1 Å. Este valor es cercano al del plano (100) del grafito [Baker, 2010], confirmando la presencia de carbonos  $sp^2$  en la estructura de los CDs.

#### 4.1.6 Caracterización mediante espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica poderosa para la caracterización de materiales de carbono, por lo que se utilizó para estudiar los CDs sintetizados. Como se puede ver en la figura 4.6, el espectro Raman muestra dos picos centrados a 1330 y 1602  $cm^{-1}$ , correspondientes a las bandas D y G, respectivamente, que son características de los materiales grafiticos. La banda G se atribuye a las vibraciones de tensión en el plano de los carbonos  $sp^2$  y la banda D se atribuye al modo de

expansión/contracción fuera del plano de los carbonos  $sp^2$  en presencia de defectos estructurales [Ferrari, 2000].

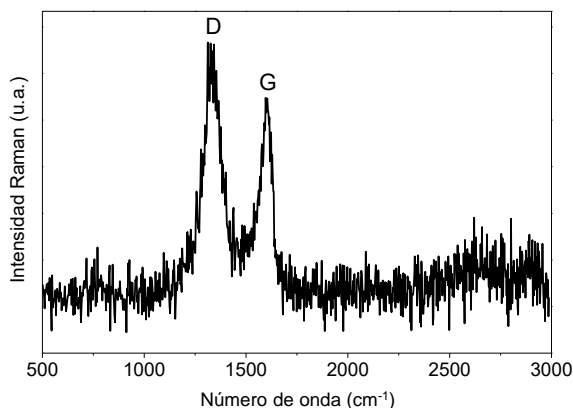


Fig. 4.6. Espectro Raman de los nanopuntos sintetizados. Los parámetros de medida fueron: láser de excitación de 632.8 nm, potencia de láser de 1 mW, tiempo de integración de 0.5 s y objetivo 50x.

La relación de intensidades  $I_D/I_G$  es un indicador de la cristalinidad o desorden en los sistemas gráficos. Para los CDs sintetizados la relación  $I_D/I_G$  es  $\sim 1.22$ , lo que indica una estructura relativamente ordenada, probablemente debida a la presencia de grupos funcionales en su superficie provenientes de los precursores.

#### 4.1.7 Caracterización mediante espectrofotometría

Los CDs son conocidos por sus propiedades ópticas, especialmente por su fuerte fluorescencia, por lo que se conocen también como carbono fluorescente [Li, 2012]. Por este motivo, los CDs sintetizados se estudiaron mediante espectroscopía de absorción UV-visible y de fluorescencia. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 4.7. En el espectro de absorción (A) se puede observar un pico ancho alrededor de 360 nm, adscrito a las transición  $n-\pi^*$  de  $C=O$ , característico de los CDs [Qu, 2013].

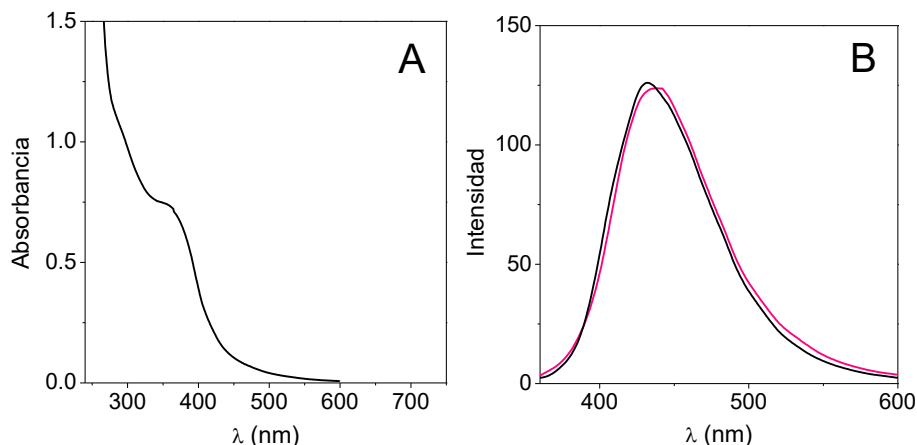


Fig. 4.7. Espectros de (A) absorción y (B) emisión ( $\lambda_{ex} = 260$  nm, — y  $\lambda_{ex} = 360$  nm, —) de una disolución  $0.56 \mu\text{M}$  de CDs en tampón fosfato  $0.1$  M pH  $7.0$ .

En la figura 4.7B se muestran los espectros de emisión de los CDs con diferentes longitudes de onda de excitación,  $260$  nm (—) y  $360$  nm (—). Se puede observar que el máximo de emisión depende de la longitud de onda de excitación: aparece a  $440$  nm cuando se excita a  $260$  nm y a  $431$  nm cuando se excita a  $360$  nm. En ambos casos se obtuvieron bandas estrechas, con una anchura similar, lo que confirma que los CDs sintetizados presentan un tamaño homogéneo, por lo que la dependencia de la fluorescencia con la longitud de onda de excitación no se debe a la existencia de CDs de diferentes tamaños [Ahmed, 2015]. Este fenómeno se puede explicar por la presencia de diferentes grupos funcionales en la superficie de los CDs de manera que la emisión se produce desde diferentes niveles de energía [Tang, 2012] y es una característica de este material, que tiene un gran potencial en diversas aplicaciones, ya que la emisión se puede regular en función de la longitud de onda de excitación y del material de partida utilizado para su síntesis. Esto hace que se puedan preparar CDs con fluorescencia a la carta. Además, los CDs tienen un gran desplazamiento de Stokes, lo que es beneficioso para poder distinguir al objetivo de la señal de fondo en técnicas de imagen [Liu, 2011a].

#### 4.1.7.1 Cálculo del coeficiente de extinción de los nanopuntos

Con objeto de estudiar en profundidad el material sintetizado se estimó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de los nanopuntos. Para ello, se registraron los espectros de absorción de dispersiones de CDs en concentraciones crecientes entre 14 y 42  $\mu\text{M}$  (figura 4.8). A partir de la representación de la absorbancia a 360 nm de estas dispersiones frente a la concentración se estimó el coeficiente de extinción. El valor obtenido fue de  $1.98 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El coeficiente de extinción molar calculado se utilizó para estimar la concentración de dispersiones de CDs de concentración desconocida.

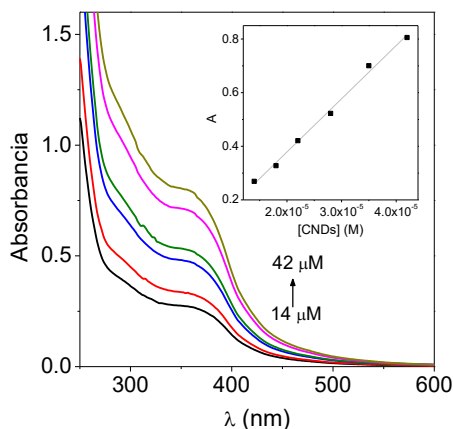


Fig. 4.8. Espectros de absorción de disoluciones de CDs en concentraciones entre 14 y 42  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Inserto: Absorbancia a 360 nm frente a la concentración de CDs.

## 4.2 Interacción de los nanopuntos de carbono con ADN

En la bibliografía se encuentran referencias respecto a la interacción entre los CDs y el ADN. Estas interacciones provocan cambios en sus propiedades ópticas [Milosavljevic, 2015]. Por este motivo, se estudió la interacción entre los CDs y el ADN mediante técnicas espectrofotométricas. Para estos estudios se ha elegido un ADN de elevado peso molecular de timo de ternera (ctADN) como modelo biológico experimental.

#### 4.2.1 Estudio de la interacción de los CDs con ADN mediante espectrofotometría de emisión de fluorescencia

Teniendo en cuenta que los CDs sintetizados presentan fluorescencia (figura 4.7) se estudió la interacción entre el ADN y los CDs mediante espectrofotometría de emisión de fluorescencia. En la figura 4.9 se muestran los espectros de emisión excitando a 260 nm dispersiones de CDs en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de ctADN de cadena doble (ds-ctADN) entre 60 y 750  $\mu\text{M}$ , tras 24 horas de incubación para favorecer la interacción entre ellos.

En ausencia de ADN (—) se observa la banda simétrica característica de los CDs a 440 nm. A medida que se va aumentando la concentración de ADN (—) se produce una disminución gradual de la intensidad de emisión de esa banda. Esta amortiguación de la fluorescencia observada en los CDs tras su unión con ADN se debe a una transferencia de carga fotoinducida [Wang, 2009b] entre los CDs y el ADN. En este caso el ADN actúa como aceptor de electrones y la carga se deslocaliza en el sistema  $\pi$  de los pares de bases [Chen, 1998].

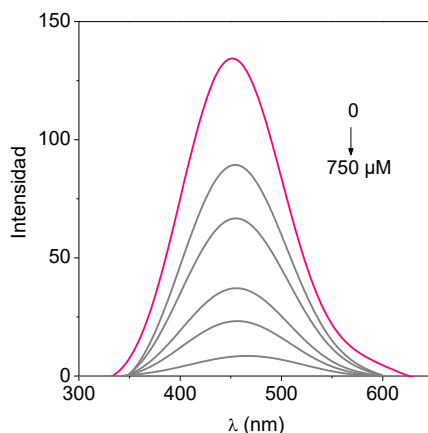


Fig. 4.9. Espectros de emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ) de disoluciones de CDs 1.3  $\mu\text{M}$  en ausencia (—) y en presencia (—) de ds-ctADN en concentraciones entre 60 y 750  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

La fuerza de la interacción entre los CDs y el ADN se puede cuantificar mediante la constante de amortiguación ( $K_{\text{SV}}$ ). Esta constante se puede calcular a partir de los

valores de fluorescencia en el máximo de emisión (440 nm) de la figura 4.9 utilizando la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[ADN]$$

donde  $F_0$  representa la fluorescencia de los CDs en ausencia de ADN y  $F$ , la fluorescencia en presencia de concentraciones crecientes de ds-ctADN. De la representación de  $F_0/F$  frente a la concentración de ADN para una concentración constante de CDs se obtiene la recta de la figura 4.10. La pendiente de esa recta es la constante de amortiguación ( $K_{SV}$ ), cuyo valor resultó ser  $1.4 \pm 0.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Este valor es comparable a los descritos en la bibliografía para complejos y ligandos que interaccionan fuertemente con el ADN y cuyo modo principal de interacción es la intercalación, como el pentaamín rutenio [3-(2-fenantren-9-il-vinil)-piridina], con un valor de  $K_{SV}$  de  $2.0 \pm 0.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  [García, 2008a] o el cloruro de (9-antril)metilamonio, el cloruro de N-etil-(9-antril)metilamonio y el cloruro de 3-(9-antril)propilamonio, con valores de  $K_{SV}$  de  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.2 \times 10^4$ , and  $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente [Kumar, 2000].

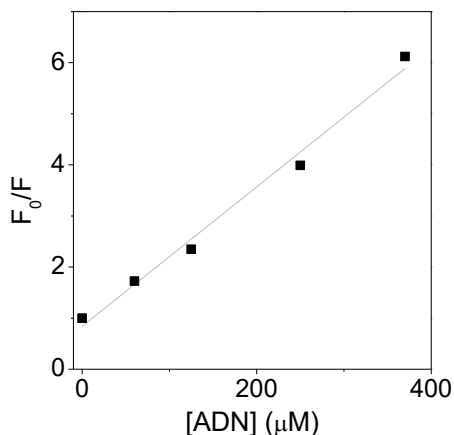


Fig. 4.10. Representación de la relación de intensidades de fluorescencia a 440 nm entre la disolución que solo contiene CDs y las que contienen CDs y ds-ctADN frente a la concentración de ADN.

#### 4.2.2 Estudio de la temperatura de desnaturalización

El ADN está formado por dos cadenas complementarias unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno. El aumento de la temperatura puede provocar la ruptura de esos enlaces de hidrógeno, de manera que las dos cadenas se separan. La temperatura a la que la mitad de las cadenas se encuentran desnaturalizadas, es decir, como cadenas sencillas, se conoce como temperatura de desnaturalización. La interacción del ADN con otros compuestos da lugar a que se fortalezcan o se debiliten las uniones de la doble cadena, por lo tanto, puede provocar variaciones en esta temperatura. Normalmente, cuando la interacción se produce por intercalación del compuesto entre las bases, se produce una estabilización de la doble hélice, lo que conduce a un aumento de la temperatura de desnaturalización [Waring, 1965]. Por tanto, la determinación de la temperatura de desnaturalización es una forma de elucidar la interacción del ADN con un determinado compuesto. De acuerdo con esto, la diferencia en la temperatura de desnaturalización del ADN en ausencia y en presencia de nanopuntos de carbono puede dar una idea del modo de interacción entre ellos.

La temperatura de desnaturalización del ADN, tanto en ausencia como en presencia de CDs, se determinó midiendo la absorbancia de la banda de ADN a 260 nm de una disolución que solo contenía ds-ctADN y otra que contenía ds-ctADN y CDs a medida que se va aumentando gradualmente la temperatura. En la figura 4.11 se muestran las curvas de desnaturalización, que son una representación de la absorbancia relativa frente a la temperatura, donde la absorbancia relativa es la relación entre la absorbancia del ADN para cada temperatura ( $A$ ) y la absorbancia del ADN a la temperatura inicial ( $A_0$ ). A partir del punto medio de la transición hipercrómica se calculó la temperatura de desnaturalización. En la gráfica se observa que la temperatura de desnaturalización es prácticamente la misma (67 °C) en ausencia (—) y en presencia (—) de los CDs. Este resultado no concuerda con lo esperado para un modo de interacción intercalativo.

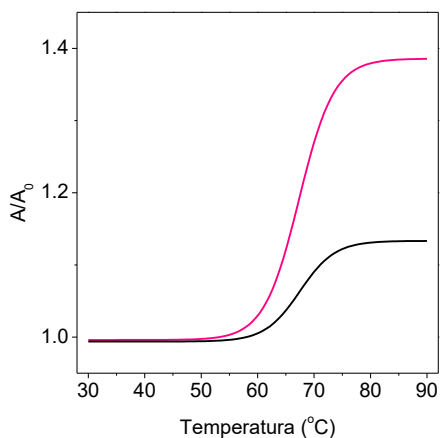


Fig. 4.11. Representación de la absorbancia relativa frente a la temperatura de una disolución 60  $\mu\text{M}$  de ds-ctADN en ausencia (—) y en presencia (—) de CDs 17  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

### 4.3 Nanoestructuración del electrodo

Los CDs sintetizados se emplearon para la nanoestructuración de electrodos con la idea de incorporar las ventajas de los nanomateriales al desarrollo de dispositivos sensores electroquímicos. Se modificaron electrodos serigraviados de oro con nanopuntos de carbono, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos.

Los electrodos nanoestructurados resultantes se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía de barrido electrónico (SEM). También se estudiaron sus propiedades electroquímicas mediante voltamperometría cíclica.

#### 4.3.1 Caracterización morfológica de la superficie nanoestructurada mediante SEM

Para obtener una idea de la disposición de los CDs sobre la superficie del electrodo nanoestructurado se obtuvieron las imágenes de SEM. En la figura 4.12 se muestra la imagen de los CDs depositados sobre una superficie de oro con distinto nivel de magnificación. Se puede observar que la superficie de oro se encuentra parcialmente cubierta por los CDs, que se pueden distinguir claramente como puntos distribuidos



aleatoriamente sobre la superficie del oro. Además, se puede apreciar que los CDs presentan un tamaño homogéneo, con una morfología casi esférica.

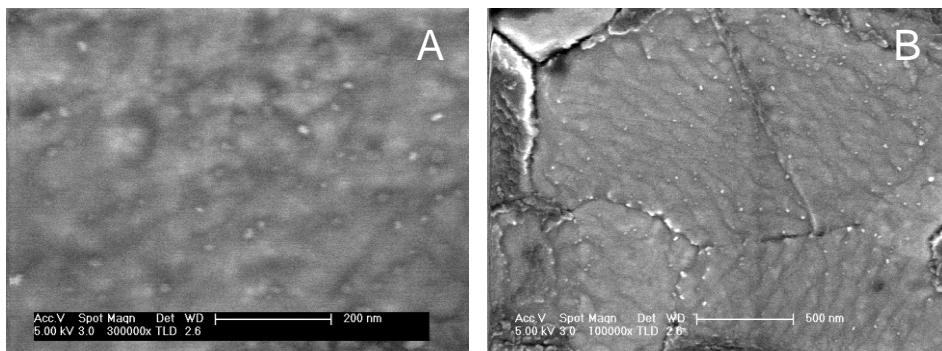


Fig. 4.12. Imágenes de SEM de los CDs sintetizados depositados sobre un sustrato de oro a con una magnificación de (A) 300000x y (B) 100000x.

#### 4.3.2 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante voltamperometría cíclica

Se espera que la nanoestructuración de los electrodos serigrafiados de oro con los CDs afecte a sus propiedades electroquímicas, por lo que se estudió su respuesta ciclovoltamperométrica en ácido sulfúrico 0.1 M y se comparó con el ciclovoltamperograma de un electrodo de oro sin modificar en el mismo medio. Como se puede observar en la figura 4.13 (—), el voltamperograma característico del oro cambia tras la modificación con los CDs (—). En el electrodo nanoestructurado la onda de oxidación aumenta en intensidad y se desplaza a potenciales más positivos, de 0.81 V a 0.87 V. Sin embargo, el pico agudo de reducción disminuye en intensidad y se desplaza a potenciales más positivos. Este comportamiento indica que se ha producido un cambio en la superficie del electrodo al estar presentes los CDs, de manera que se obtiene una superficie mixta de oro y carbono.

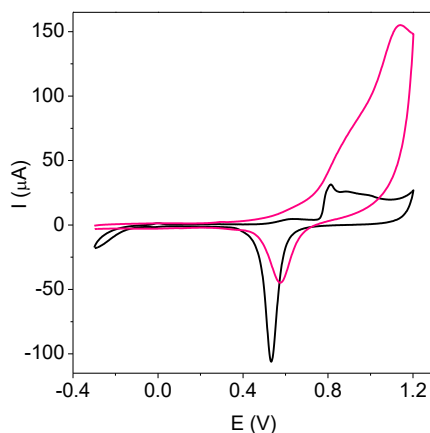


Fig. 4.13. Voltamperogramas de AuSPE (—) y AuSPE nanoestructurado con CDs (—) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Se estudió también la respuesta del electrodo nanoestructurado en tampón fosfato. Como se puede apreciar en la figura 4.14 (—) no aparece ningún proceso redox en el intervalo de potencial estudiado. Si esta respuesta se compara con la obtenida para un electrodo no modificado (—), en el electrodo nanoestructurado se observa una mayor corriente capacitativa debido al aumento del área electroquímica.

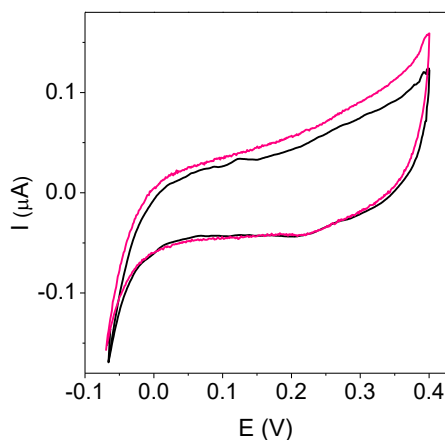


Fig. 4.14. Voltamperogramas de AuSPE (—) y AuSPE nanoestructurado con CDs (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.3.2.1 Caracterización de los electrodos nanoestructurados mediante voltamperometría cíclica utilizando sondas electroquímicas

Se estudió el comportamiento electroquímico de los electrodos nanoestructurados en presencia de dos sondas redox, concretamente, la safranina, que presenta carga positiva, y el  $K_3[Fe(CN)_6]$ , que presenta carga negativa, y se comparó con el del electrodo no modificado.

En la figura 4.15A se muestran los voltamperogramas obtenidos con los electrodos de oro nanoestructurados con CDs y sin nanoestructurar en presencia de safranina. Se puede observar en ambos casos la respuesta ciclovoltamperométrica característica de la safranina, con el par redox adscrito a la oxidación/reducción de la safranina en medio acuoso, debido a una de las dos transiciones electrónicas de la safranina [Heli, 2007]. En el caso del electrodo nanoestructurado (—) se obtuvo un potencial formal ( $E^0$ ) de -0.694 V y la separación de potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ) es de 76 mV, valor muy cercano a la que corresponde a un proceso redox reversible de un electrón difundiendo libremente. Al comparar este valor con el obtenido para un electrodo sin nanoestructurar (—), se observa que este es mayor, 97 mV, indicando una mayor irreversibilidad del proceso. Por lo tanto, con base en estos resultados se puede afirmar que la nanoestructuración de electrodos de oro con nanopuntos de carbono causa no solo un aumento en el área específica, que explicaría el aumento en la intensidad de corriente, sino también una mejora en la transferencia electrónica del sistema, lo que hace pensar que los nanopuntos están involucrados en el proceso de oxidación/reducción como consecuencia de la existencia de un estado redox en la superficie de los CDs, actuando como promotores de la transferencia de carga entre la sonda redox (la safranina) y la superficie electródica.

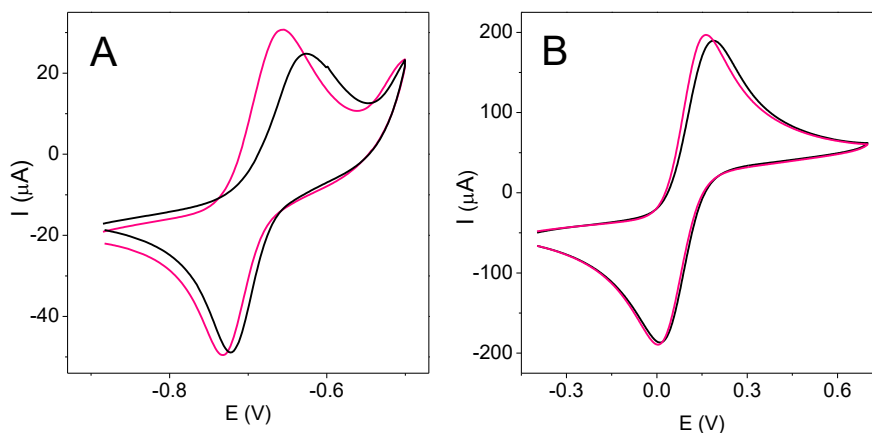


Fig. 4.15. Voltamperogramas de AuSPE (—) y AuSPE nanoestructurado con CDs (—) en una disolución de (A) safranina 1.0 mM y (B)  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  5.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Cuando la sonda está cargada negativamente, como es el caso del  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , no se observan diferencias significativas en los voltamperogramas (figura 4.15B) correspondientes al electrodo de oro nanoestructurado (—) o no (—). La ligera disminución en la separación de picos sugiere que no existe repulsión electrostática entre la sonda redox y el electrodo nanoestructurado con CDs, como se podría esperar, ya que, según las medidas de potencial zeta, los CDs presentan carga negativa.

Estos resultados indican que las plataformas generadas por nanoestructuración de los electrodos con los CDs presentan un mejor comportamiento electroquímico. Además, la ausencia de repulsión electrostática entre la sonda redox negativa y el AuSPE nanoestructurado indica que la presencia de los CDs en la superficie del electrodo no aporta carga negativa.

#### 4.4 Aplicaciones analíticas de los AuSPE nanoestructurados con CDs

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se evaluó la posibilidad de utilizar los electrodos de oro nanoestructurados con CDs como transductores electroquímicos para su aplicación en el desarrollo de dispositivos sensores de ADN.

Según la bibliografía, las cadenas de ADN interaccionan con nanomateriales de carbono, como grafeno y CNTs, mediante apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de las bases del ADN, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [Manohar, 2008; Huang, 2013], es de esperar que también interaccionen en una forma similar con los CDs. Algunos estudios han demostrado que el ADN de cadena sencilla (ssADN) se adsorbe de manera más fuerte y rápida sobre el grafeno que el ADN de cadena doble (dsADN) [He, 2010; Huang, 2013], debido a que en la estructura de doble hélice del dsADN las bases se encuentran protegidas y únicamente están expuestos los grupos fosfato, lo que impide las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$ . Además, las cadenas de dsADN son más rígidas, lo que provoca que tengan menor difusividad y esto puede contribuir a que la adsorción sea más lenta. Esta diferencia en la interacción del ssADN o el dsADN con el grafeno es muy útil en el desarrollo de biosensores y se espera que suceda también en los CDs, ya que estos dispositivos se basan en la inmovilización de un oligonucleótido (sonda) sobre la superficie del electrodo. El analito, que será una cadena sencilla de ADN totalmente complementaria a esta sonda, se hibridará con ella y esta es la base del reconocimiento. Para detectar el evento de hibridación, una de las estrategias empleadas en el desarrollo de biosensores electroquímicos de ADN es el uso de una sonda redox, es decir, una molécula electroquímicamente activa que interaccione con la cadena sencilla en diferente extensión que con la doble. De entre las diferentes moléculas electroquímicamente activas que se han utilizado para este propósito, en el desarrollo de este biosensor se ha empleado la safranina de acuerdo con estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación en los que se demostró la utilidad de este colorante como indicador electroquímico del evento de hibridación [García-Mendiola, 2016].

La safranina (figura 4.16) es un colorante catiónico que pertenece a la familia de las fenazinas. Se utiliza como colorante biológico en la clasificación bacteriana en Gram+ y Gram- [Kaplan, 1933], además de tener actividad antimalaria [Vennerstrom, 1995]. También se ha utilizado en la detección de  $\text{NO}_2$  atmosférico [Huang, 2000], como fotosensibilizador en reacciones de transferencia energética [Saravanan Jayanthi, 1998] o en fotopolimerización [Encinas, 1996] y en células solares basadas en colorantes [Jana, 2000].

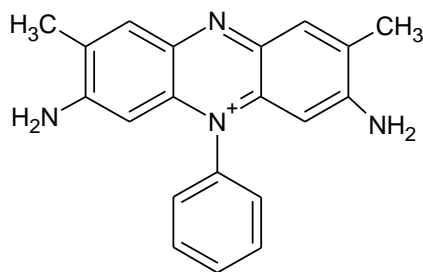


Fig. 4.16. Estructura de la safranina.

Existen numerosos estudios sobre la interacción entre la safranina y el ADN [Khan, 2014b; Khan, 2014a; Saha, 2010; Sarkar, 2008; Cao, 1998], de los que se concluye que la interacción es de tipo intercalativo, favorecida por la estructura plana que presenta la safranina, como se puede observar en la figura 4.16, aunque también hay una componente electrostática. En la bibliografía también se describe un biosensor óptico de ADN basado en puntos cuánticos y safranina [Wang, 2016], en el que se describe que la safranina produce una amortiguación de la fluorescencia de los puntos cuánticos y la adición de ADN provoca una recuperación de la fluorescencia debido a la fuerte interacción entre el ADN y la safranina.

Además, debido a que presenta grupos electroactivos en su estructura, se ha utilizado en el desarrollo de un sensor electroquímico de ADN en el que la safranina interacciona de manera diferente con dsADN y ssADN [García-Mendiola, 2016], dando lugar a respuestas voltamperométricas muy diferentes para electrodos modificados con dsADN y ssADN. Por este motivo, en este capítulo se ha elegido la safranina como indicador del evento de hibridación en el biosensor electroquímico de ADN desarrollado basado en AuSPEs nanoestructurados con CDs.

Para que la safranina pueda ser utilizada como indicador redox del evento de hibridación es necesario que la respuesta del electrodo modificado sea diferente cuando la safranina se une a la cadena doble o sencilla de ADN. Por este motivo, con el objeto de evaluar la competencia de la safranina como indicador electroquímico se modificaron AuSPEs nanoestructurados con CDs con ss-ctADN y ds-ctADN. Para obtener la respuesta electroquímica del indicador es necesaria su incorporación a la superficie del electrodo nanoestructurado modificado con ADN.

Para ello, se aplicaron barridos sucesivos de potencial en presencia de safranina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, como se describe en la sección de materiales y métodos. Tras la acumulación del indicador, los electrodos modificados se lavaron con agua autoclavada y se sumergieron en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. En estas condiciones, se registró la respuesta voltamperométrica de los AuSPes nanoestructurados con CDs antes y después de la modificación con ADN.

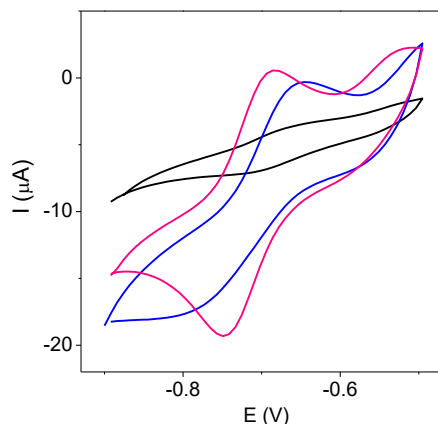


Fig. 4.17. Voltamperogramas de AuSPes nanoestructurados con CDs y modificados con ss-ctADN (—), con ds-ctADN (—) o no modificado (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 tras la acumulación de safranina mediante 100 barridos de potencial a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 4.17 se puede apreciar que la safranina no se acumula en el electrodo nanoestructurado con CDs (—), como es evidente por la baja señal obtenida. Sin embargo, en los electrodos nanoestructurados con ss-ctADN (—) o con ds-ctADN (—) se observa una alta corriente de pico debida a la oxidación/reducción de la safranina acumulada en la capa de ADN. Esta corriente es mayor para ds-ctADN que para ss-ctADN, como se espera de un modo de interacción intercalativo, en el que la safranina se sitúa entre los pares de bases de la doble cadena de ADN. La corriente observada en el caso de ss-ctADN se puede explicar por una interacción electrostática, en la que la carga positiva presente en la estructura de la safranina se puede ver atraída por la carga negativa de los grupos fosfato presentes en el ADN.

La diferencia observada en la intensidad de corriente para los electrodos nanoestructurados y modificados con ds-ctADN y ss-ctADN tras la acumulación de

safranina permite afirmar que esta puede ser utilizada como indicador redox del evento de hibridación en biosensores amperométricos de ADN.

#### **4.5 Desarrollo de un biosensor nanoestructurado de ADN**

Los métodos tradicionales de análisis genético requieren largos tiempos de análisis y metodologías complejas, por lo que los biosensores electroquímicos de ADN se presentan como una alternativa rápida, sencilla y de bajo coste para la detección de secuencias específicas de ADN. Con estos biosensores se puede detectar, por ejemplo, la presencia de microorganismos patógenos en fluidos biológicos, permitiendo la detección temprana de infecciones causadas por dichos patógenos. Además, la detección se basa en la hibridación y pueden, por tanto, detectar mutaciones en las cadenas de ADN, que muchas veces son responsables de la resistencia bacteriana a los antibióticos o, incluso, de la aparición de enfermedades asociadas a mutaciones genéticas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a las ventajas de la nanoestructuración de electrodos con CDs y la interacción de estos con ADN, se evaluó la posibilidad de utilizar los electrodos de oro nanoestructurados con CDs como transductores electroquímicos para el desarrollo de dispositivos biosensores de ADN.

##### **4.5.1 Detección de secuencias de *Helicobacter pylori***

Con el propósito de desarrollar un biosensor de ADN basado en los electrodos nanoestructurados con CDs para el reconocimiento de secuencia específicas de ADN se empleó como modelo una secuencia corta de 25 bases correspondiente a la bacteria *Helicobacter pylori* (HP2C) como sistema prototipo. Esta secuencia se ha elegido como caso de estudio con la idea de desarrollar una metodología de gran aplicabilidad.

La bacteria *Helicobacter pylori* es un analito de interés clínico, ya que es responsable de causar enfermedades gástricas tales como úlceras, gastritis y dos tipos de cáncer de estómago [Blaser, 1990; Uemura, 2001], que afectan a gran parte de la población mundial. Además, mutaciones en su ADN pueden provocar resistencia a los



antibióticos [Mégraud, 2004]. Los métodos habituales para la detección de mutaciones en secuencias de *H. pylori* están basados en técnicas de PCR, como RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), inmunoensayo enzimático de ADN o ensayo de hibridación reversa en tira con sondas (LiPA) y son largos y complejos [Occhialini, 1997; Pina, 1998; van Doorn, 1999], por lo que el desarrollo de métodos sensibles que permitan un diagnóstico rápido y específico resulta de gran interés.

El diseño del biosensor desarrollado se muestra en el esquema de la figura 4.18 y consta de las siguientes etapas: nanoestructuración de la superficie con los CDs, inmovilización de la sonda de ADN, hibridación con la secuencia analito, acumulación del indicador electroquímico y detección electroquímica del evento de hibridación.

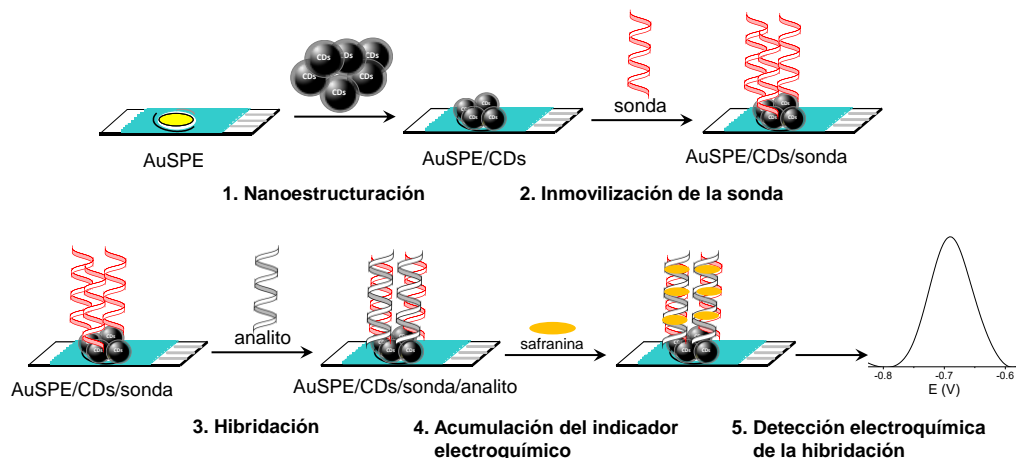


Fig. 4.18. Etapas del desarrollo del biosensor de ADN.

#### 4.5.1.1. Nanoestructuración de la superficie del electrodo de oro

La nanoestructuración del electrodo de oro con nanopuntos de carbono se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos, produciendo las plataformas nanoestructuradas descritas en el apartado 4.3 (AuSPE/CDs).

#### 4.5.1.2. Inmovilización de la sonda de ADN

La inmovilización de la sonda de captura es una de las etapas más importantes en el desarrollo de los biosensores de ADN, que afecta a su funcionamiento, en particular a su selectividad y sensibilidad, ya que la disposición de la sonda debe permitir el reconocimiento y la hibridación con la secuencia analito. En la mayoría de los biosensores descritos, la inmovilización de la sonda se lleva a cabo mediante quimisorción sobre electrodos de oro [García-Mendiola, 2016] o reacciones covalentes de enlace amina-ácido carboxílico sobre electrodos previamente funcionalizados [Cai, 2003b]. Sin embargo, en estos casos es necesaria la modificación química de la sonda de ADN en el extremo 5' con un grupo tiol o amina y, en algunos casos, la funcionalización química de la superficie del electrodo como paso previo a la inmovilización de la sonda. La nanoestructuración con CDs ha permitido inmovilizar directamente oligonucleótidos sin modificar sobre los electrodos, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. La sonda utilizada fue una secuencia sintética de 25 bases complementaria a la secuencia estudiada de la bacteria *H. pylori* (HP1). La concentración de la sonda se optimizó, eligiendo 40  $\mu\text{M}$  [del Pozo, 2005b].

El electrodo modificado con la sonda se representa en el esquema de la figura 4.18 como AuSPE/CDs/sonda.

#### 4.5.1.3. Hibridación con la secuencia analito

Una vez inmovilizada la sonda en la superficie del electrodo nanoestructurado se llevó a cabo la hibridación con la secuencia analito. La hibridación consiste en la unión de dos cadenas sencillas de ADN por reconocimiento entre secuencias de bases complementarias. La reacción de hibridación aporta especificidad al biosensor. Esta reacción está condicionada por factores tales como la concentración de la secuencia analito, la temperatura y el tiempo de hibridación y condiciones del medio en el que lleva a cabo. Se utilizaron las condiciones de hibridación optimizadas [García-Mendiola, 2016], según se ha descrito en la sección de materiales y métodos. La secuencia analito (HP2C de *H. pylori*), es totalmente complementaria a la sonda, HP1. Además, como control se empleó también una secuencia totalmente no

complementaria (HP2NC). En el esquema de la figura 4.19 se representa el proceso de hibridación con la secuencia complementaria, HP2C, para la que se produce el reconocimiento y la hibridación para formar una doble cadena, y con la secuencia no complementaria, con la que no se produce el reconocimiento y, por tanto, no hay unión entre las cadenas sencillas.

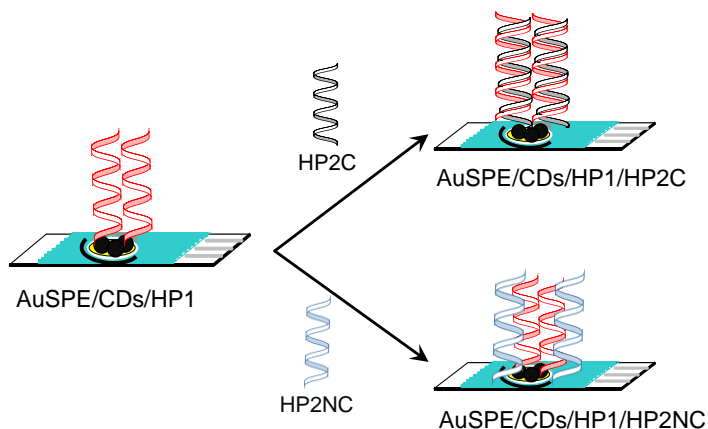


Fig. 4.19 Esquema del proceso de hibridación de la sonda con las cadenas complementaria (HP2C) y no complementaria (HP2NC).

#### 4.5.1.4. Acumulación del indicador

Como se ha comentado anteriormente, el indicador electroquímico utilizado como detector del evento de hibridación es la safranina, que se ha demostrado que interacciona preferentemente con el ADN de cadena doble (figura 4.17). El indicador se acumuló en el ADN hibridado sobre los electrodos nanoestructurados con CDs mediante la aplicación de barridos cíclicos de potencial entre -0.9 y -0.5 V en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, como se describe en la sección de materiales y métodos. Para obtener la señal del blanco se siguió el mismo procedimiento, excepto la etapa de hibridación con la secuencia analito.

##### 4.5.1.4.1 Optimización del número de barridos de acumulación de safranina

Con el objeto de optimizar el proceso de acumulación del indicador se determinó el número de barridos de potencial que dan lugar a los mejores resultados. Se estudió la

respuesta de los electrodos nanoestructurados con CDs y modificados con ds-ctADN en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 tras la acumulación de safranina mediante un número de barridos de potencial entre 1 y 100.

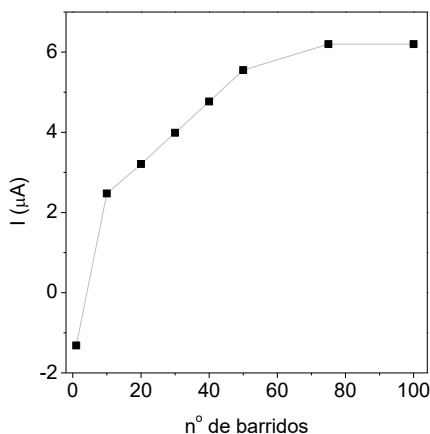


Fig. 4.20. Respuesta de AuSPE/CDs modificado con ds-ctADN a una disolución de safranina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en función del número de barridos de potencial a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 4.20 se muestra la respuesta del electrodo en función del número de barridos de potencial. Se puede observar que la intensidad aumenta con el número de barridos hasta alcanzar un valor máximo para 80 barridos, y después se mantiene para un número mayor de ciclos. Teniendo en cuenta estos resultados y con el fin de asegurar que se produce la acumulación del indicador electroquímico se optó por realizar 100 barridos cíclicos de potencial como el procedimiento más adecuado para la acumulación de la safranina.

#### 4.5.1.5. Detección electroquímica

Tras la acumulación del indicador es necesaria una etapa de limpieza con agua esterilizada para eliminar las moléculas de safranina que no se encuentren fuertemente unidas a las cadenas de ADN. Una vez lavado, se sumergió el electrodo en una disolución tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 y se registró la respuesta voltamperométrica de la safranina acumulada. Para poder discriminar mejor entre la

señal y la corriente de fondo y alcanzar una mejor sensibilidad, la técnica utilizada en los estudios siguientes fue voltamperometría diferencial de impulsos (DPV).

En la figura 4.21 se muestran los voltamperogramas diferenciales de impulsos obtenidos para electrodos nanoestructurados modificados únicamente con la sonda, HP1, o modificados con la sonda e hibridados con las secuencias complementaria, HP2C, y no complementaria, HP2NC. Como se puede apreciar, se observa un aumento en la respuesta del biosensor cuando la sonda se hibrida con la cadena complementaria, HP2C (—), con respecto a la señal obtenida para la sonda, HP1 (—). Sin embargo, en el caso de la hibridación con la secuencia no complementaria, HP2NC (—), la respuesta electroquímica es similar a la obtenida para el electrodo modificado únicamente con la sonda. Estos resultados concuerdan con lo esperado para un modo de interacción intercalativo entre el indicador, safranina, y el ADN, en el que la safranina se asocia preferentemente al ADN de cadena doble, en este caso, cuando la sonda se hibrida con su cadena complementaria, HP2C. Sin embargo, al no producirse la hibridación por falta de complementariedad con la secuencia HP2NC, la acumulación del indicador se produce en menor medida y, por tanto, la señal electroquímica obtenida es menor.

Las diferencias observadas en las intensidades de pico antes y después de la hibridación sugieren que el biosensor nanoestructurado desarrollado tiene la capacidad de reconocer secuencias específicas de ADN.

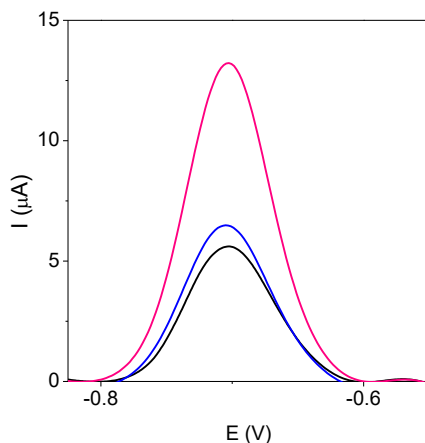


Fig. 4.21. DPV de AuSPE/CDs/HP1 antes (—) y después de la hibridación con una secuencia complementaria, HP2C (—), o con una no complementaria, HP2NC (—), tras la acumulación de safranina en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Con objeto de evaluar el papel de los nanopuntos de carbono en el biosensor desarrollado, se llevó a cabo el mismo experimento sobre los electrodos serigrafiados de oro, pero sin nanoestructurar su superficie con los CDs y también con electrodos serigrafiados de carbono no nanoestructurados, para comprobar si, al estar compuestos ambos por carbono, el efecto observado era similar al obtenido al nanoestructurar la superficie de oro con los CDs. Los voltamperogramas diferenciales de impulsos obtenidos en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 tras la acumulación de safranina en electrodos modificados con la sonda HP1 y la sonda hibridada con la secuencia complementaria, HP2C, para ambos electrodos se muestran en la figura 4.22. Se puede observar que en ninguno de los dos casos se produce un aumento en la respuesta voltamperométrica tras la hibridación.

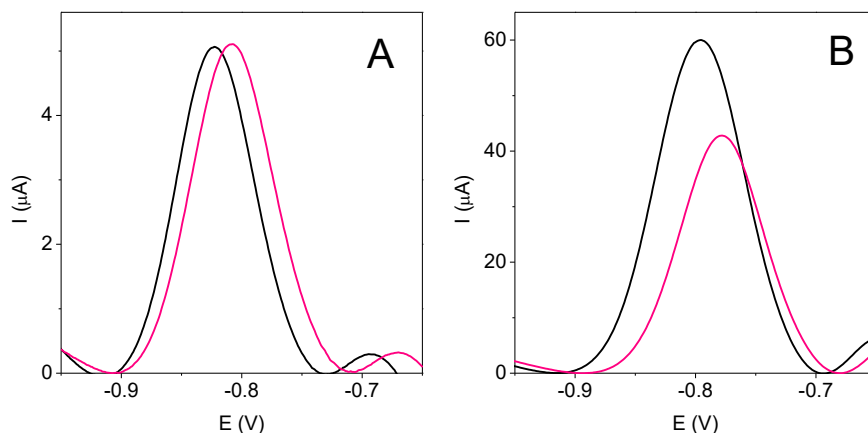


Fig. 4.22. DPV de (A) AuSPE y (B) CSPE modificados con la sonda HP1 antes ( $\blackrightarrow$ ) y después de la hibridación con una secuencia complementaria, HP2C ( $\pinkrightarrow$ ), tras la acumulación de safranina en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Estos resultados indican que los nanopuntos de carbono juegan un papel muy importante, ya que permiten la inmovilización de la sonda de ADN de manera que esta conserva su capacidad de reconocimiento e hibridación sin necesidad de modificar químicamente la sonda de ADN en un extremo, como sería necesario para la inmovilización de la sonda sobre electrodos de oro mediante quimisorción de tioles o mediante enlaces covalentes.

#### 4.5.1.1 Propiedades analíticas del biosensor de ADN

Las propiedades analíticas del biosensor de ADN desarrollado se obtuvieron registrando su respuesta voltamperométrica en presencia concentraciones crecientes de la secuencia complementaria, HP2C, en el medio de hibridación (figura 4.23). Se puede observar que la intensidad de corriente a  $-0.70 \text{ V}$  aumenta con la concentración de HP2C de forma lineal ( $y = 0.32x + 6.3$ ,  $R^2 = 0.98$ ) en el intervalo de concentraciones entre  $0.01$  y  $20 \mu\text{M}$ . Los datos representados corresponden al valor medio de cinco medidas realizadas con cinco biosensores preparados de la misma forma.

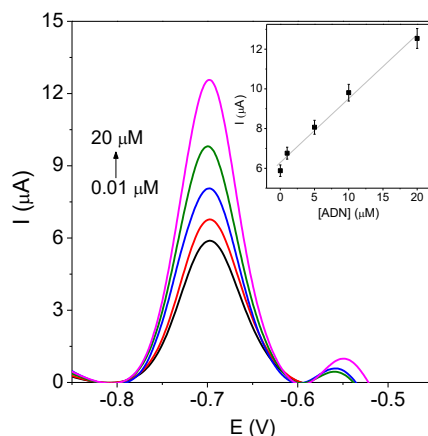


Fig. 4.23. DPV de AuSPE/CDs/HP1 tras la hibridación con una secuencia complementaria, HP2C, en concentraciones entre 1 y 20  $\mu\text{M}$ , tras la acumulación de safranina en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Inserto: Intensidad obtenida frente a la concentración de ADN.

Los parámetros analíticos del biosensor se obtuvieron del tramo lineal de la curva de calibrado (figura 4.23 inserto). Se determinó la sensibilidad a partir de la pendiente de la recta, obteniéndose un valor muy alto de  $3.12 \pm 0.09 \times 10^{-1} \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación se calcularon como la concentración correspondiente a la señal del blanco, es decir, la correspondiente a la sonda HP1, más tres o diez veces su desviación estándar, respectivamente. Los valores obtenidos fueron 0.16 nM y 0.53 nM, respectivamente.

Tabla 4.2. Parámetros analíticos del biosensor nanoestructurado de *Helicobacter pylori*.

Límite de detección (nM)	Límite de cuantificación (nM)	Intervalo lineal ( $\mu\text{M}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (R.S.D.%)
0.16	0.53	< 20	$3.12 \times 10^{-1}$	5

También se estimó la reproducibilidad del biosensor desarrollado a partir de la respuesta de cinco biosensores preparados mediante el mismo procedimiento y se obtuvo una desviación estándar relativa del 5% para una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de



HP2C, que es inferior al valor de  $CV_H$  calculado para esa concentración de 10.2, lo que asegura la buena reproducibilidad del biosensor desarrollado.

Estos resultados indican que el biosensor nanoestructurado desarrollado reúne las características adecuadas para ser utilizado en la detección de una secuencia específica de ADN, ya que presenta un amplio intervalo lineal de respuesta, con bajos límites de detección y cuantificación y buena reproducibilidad.

#### **4.5.1.2 Detección de un polimorfismo de un solo nucleótido**

Se evaluó la selectividad del biosensor desarrollado viendo si es capaz de detectar la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido. Las alteraciones en la secuencia de ADN de la bacteria *H. pylori* provocan su resistencia a determinados antibióticos. En concreto la transición o transversión de una base adenina en una secuencia de un gen de la bacteria provoca del 90% de las resistencias observadas al antibiótico claritromicina [Mégraud, 2004], por lo que es de gran importancia la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), es decir, una sola base mutada, en esa secuencia.

Se evaluó, pues, la capacidad del biosensor desarrollado para detectar un SNP en la secuencia analito de 25 bases. Para ello, se hibridó la sonda HP1 con una secuencia analito con una única base mutada en el medio de la secuencia, HP2SM. Se espera que la hibridación de HP1 con la secuencia HP2SM dé lugar a la formación de una doble hélice distorsionada, como se muestra en el esquema de la figura 4.24. Esta doble hélice distorsionada debería interaccionar con la safranina en menor extensión que la doble hélice perfecta que se forma al hibridar la sonda con la secuencia complementaria, HP2C, y, por tanto, deberían obtenerse respuestas electroquímicas diferentes.

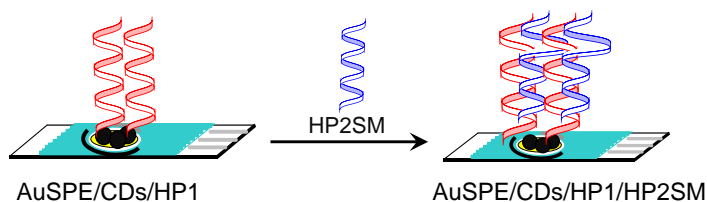


Fig. 4.24. Esquema del proceso de hibridación de la sonda con la cadena que contiene la mutación (HP2SM).

En la figura 4.25 se muestra la respuesta del biosensor a la secuencia mutada HP2SM (—). Como se puede observar, la respuesta obtenida para la secuencia mutada HP2SM es significativamente menor que la obtenida para la secuencia complementaria HP2C y mayor que la obtenida para la secuencia no complementaria HP2NC. Estos resultados pueden explicarse por una disminución en la interacción de la safranina con la doble hélice distorsionada con respecto a la doble hélice obtenida con la secuencia complementaria.

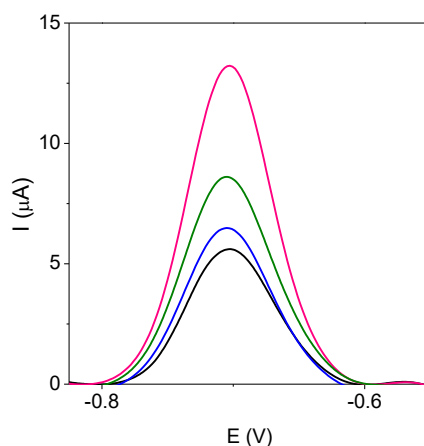


Fig. 4.25. DPV de AuSPE/CDs/HP1 antes (—) y después de la hibridación con una secuencia complementaria, HP2C (—), con una no complementaria, HP2NC (—) o con una secuencia mutada, HP2SM (—), tras la acumulación de safranina en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede afirmar que el biosensor nanoestructurado con CDs es muy selectivo y permite detectar tanto secuencias

específicas de ADN como mutaciones puntuales en secuencias cortas de 25 bases, utilizando para ello sondas de ADN no modificadas.

Al comparar el biosensor nanoestructurado desarrollado con otros biosensores para la detección de secuencias de *H. pylori* se encuentra que presenta mejores propiedades. Por ejemplo, el límite de detección obtenido con el mismo indicador para secuencias tioladas de *Helicobacter pylori* de 25 bases sobre electrodos serigrafados de oro sin nanoestructurar, siguiendo el mismo procedimiento [García-Mendiola, 2016], es de 22.5 nM, 100 veces mayor que el obtenido con el biosensor propuesto.

En la bibliografía se describen otros biosensores electroquímicos para la detección de *H. pylori* basados en el uso de indicadores redox del evento de hibridación que también presentan la capacidad de detectar polimorfismos de un solo nucleótido. Entre ellos, se encuentran biosensores que se basan en el uso del pentaamín rutenio [3-(2-fenantren-9-il-vinil)-piridina] o el 3,4-DHS como indicadores electroquímicos [García, 2008a; Revenga-Parra, 2007]. Sin embargo, en ambos casos se han utilizado sondas de ADN modificadas con un grupo tiol en un extremo para su inmovilización sobre electrodos serigrafados de oro y además, los límites de detección obtenidos son mucho más altos que el obtenido con el biosensor desarrollado, 4.6 y 8.3  $\mu$ M. respectivamente.

Si se comparan los parámetros del biosensor desarrollado con otros basados en principios de transducción diferente, como el elipsométrico basado en nanopartículas de galio para la detección de secuencias y mutaciones en secuencias de *H. pylori* se obtiene un menor límite de detección, 6 pM [García Marín, 2016], sin embargo, el biosensor electroquímico nanoestructurado desarrollado es un método más rápido y sencillo, además de permitir el uso de sondas de ADN no modificadas.

Otros biosensores ópticos descritos para detección de *H. pylori*, presentan límites de detección peores al obtenido con el biosensor desarrollado. Un ejemplo es el biosensor fotométrico basado en una sonda marcada con nanopartículas de oro, que se une al extremo opuesto de una cadena unida a la sonda de captura inmovilizada sobre un vidrio silanizado [Shahrashoob, 2016]. En este caso la respuesta se obtiene a partir de la señal plasmónica del oro y el límite de detección obtenido es de 0.5 nM. Otro ejemplo es el biosensor de fluorescencia basado en la transferencia energética de puntos cuánticos de CdTe modificados con una sonda de ADN a 5-carboxitetrametilrodamina,

también modificada con otra sonda de ADN, a través de un ADN analito que se une a ambas sondas por los extremos opuestos [Shanehsaz, 2013]. En este caso, la fluorescencia emitida por la rodamina es proporcional a la concentración de ADN analito y el límite de detección obtenido es de 4.5 nM. En ninguno de estos dos ejemplos se detectan mutaciones en la secuencia de *H. pylori*.

#### **4.5.2 Detección de mutaciones genéticas asociadas a la fibrosis quística**

Con la intención de evaluar la amplia aplicabilidad del biosensor de ADN desarrollado y teniendo en cuenta que es capaz de detectar la presencia de una sola base no complementaria en la secuencia analito, se estudió su aplicación en la detección de mutaciones genéticas basadas en no complementariedades y asociadas a enfermedades humanas en muestras reales de ADN genómico. Habitualmente, la identificación de estas mutaciones se realiza a través de la secuenciación de genes. Sin embargo, estos métodos tienen serios inconvenientes como herramientas de diagnóstico de rutina debido a que requieren mucho tiempo y esfuerzo, además de ser caros, mientras que los biosensores de ADN son métodos sencillos y de bajo coste. Por este motivo, el biosensor de ADN nanoestructurado desarrollado se aplicó a la detección de mutaciones asociadas a la fibrosis quística en ADN real de PCR extraído de células sanguíneas.

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria que provoca problemas digestivos y hepatobiliares, enfermedades respiratorias crónicas, altos niveles de cloruro en sudor y disminución de la fertilidad [Smyth, 2005]. Está causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) [McCarthy, 2005]. Aunque se conocen muchas mutaciones que afectan a este gen, en alrededor del 67% de los casos la enfermedad se produce por la mutación F508del, que consiste en la delección de tres nucleótidos, lo que causa la pérdida de un residuo de fenilalanina de la proteína CFTR [Tsui, 1992; Riordan, 1989a; Riordan, 1989b]. Se eligió esta mutación como caso de estudio con el propósito de desarrollar un método de cribado que permita diferenciar entre secuencias correspondientes al gen sin mutación o estirpe salvaje o secuencias mutadas, es decir, entre individuos sanos o enfermos de fibrosis quística.

El biosensor se desarrolló siguiendo la misma estrategia que en el caso de la secuencia de *H. pylori* y que se muestra en el esquema de la figura 4.18. En este caso, las secuencias analito contenían más de 300 bases, por lo que se utilizaron sondas más largas, concretamente de 100 bases, complementarias a la secuencia de la estirpe salvaje (WTp). El ADN analito es un fragmento de 373 bases del exón 11 del gen CFTR amplificada por PCR y puede corresponder a la estirpe salvaje (WT) o a la secuencia mutada (mut). Además, a modo de control, se utilizó también una secuencia totalmente no complementaria (NC).

Las muestras amplificadas por PCR son ADN de doble cadena, por lo que para utilizarlas como analito en su reconocimiento por el biosensor fue necesario previamente desnaturalizarlas mediante tratamiento térmico antes de la hibridación con la sonda WTp, como se describe en la sección de materiales y métodos. El reconocimiento de estas secuencias analito de ADN de cadena sencilla por el biosensor mediante hibridación con la sonda se realizó utilizando safranina como indicador. Una vez acumulada la safranina en las cadenas de ADN hibridadas se registraron los voltamperogramas diferenciales de impulsos que se muestran en la figura 4.26.

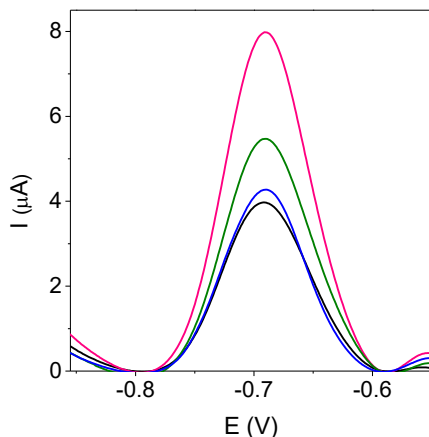


Fig. 4.26. DPV de AuSPE/CDs/WTp antes (—) y después de la hibridación con una secuencia complementaria, WT (—), con una no complementaria, NC (—), o con una secuencia mutada, mut (—), tras la acumulación de safranina en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Se puede observar que la respuesta del biosensor tras la hibridación de la sonda con la secuencia complementaria, WT (—), es mucho mayor que la obtenida para la secuencia mutada, mut (—), que, a su vez, es mucho mayor que la obtenida para la sonda, WTp (—), por lo que se puede afirmar que es posible distinguir entre secuencias que porten o no la mutación. Además, la respuesta del biosensor para la secuencia no complementaria, NC (—), es similar a la obtenida para la sonda, WTp, confirmando que no se produce la hibridación inespecífica.

Para obtener un mejor procesamiento de la señal y evitar la variación entre electrodos se calculó el porcentaje de incremento de la señal tras la hibridación con respecto a la señal de la sonda, de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ incremento} = \frac{I_{\text{analito}} - I_{\text{sonda}}}{I_{\text{sonda}}} \times 100$$

donde  $I_{\text{analito}}$  es la respuesta del biosensor para la sonda hibridada con cada uno de las secuencias analito, WT, mut y NC, e  $I_{\text{sonda}}$  es la respuesta para la sonda, WTp.

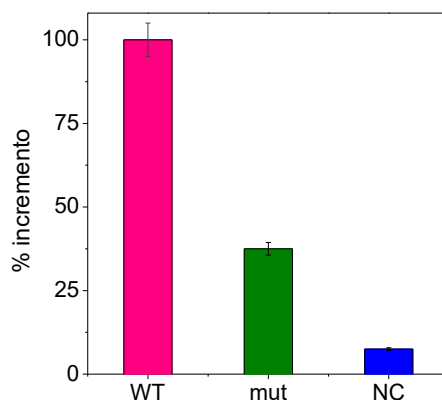


Fig. 4.27. Porcentaje de incremento de la señal con respecto a la señal de la sonda, WTp, tras la hibridación con la secuencia complementaria, WT (—), con la no complementaria, NC (—) o con la secuencia mutada, mut (—).

Como se aprecia en la figura 4.27, el incremento de la señal es del 100% cuando la hibridación se produce con la secuencia complementaria, WT (—), que corresponde a individuos sanos, mientras que este valor disminuye hasta el 37.5 % cuando la secuencia analito es una muestra portadora de la mutación, mut (—), que

corresponde a individuos enfermos de fibrosis quística. Cuando no se produce la hibridación, es decir, cuando se utiliza una secuencia no complementaria, NC (—), el incremento de la señal es inferior al 10 %. Teniendo en cuenta que el error asociado a cada medida es inferior al 5 %, se puede concluir que el método de cribado propuesto discrimina entre muestras no portadoras de la mutación y mutadas, es decir, entre pacientes sanos o enfermos de fibrosis quística.

Se evaluó la reproducibilidad a partir de la respuesta de cinco biosensores diferentes preparados siguiendo el mismo procedimiento frente a secuencias analito no mutada, mutada o no complementaria, obteniéndose una R.S.D. inferior al 5 % en todos los casos.

Estos resultados confirman que el biosensor nanoestructurado desarrollado permite diferenciar entre secuencias mutadas y no mutadas de más de 373 bases, por lo que se puede utilizar como método de cribado rápido y preciso para la detección de mutaciones genéticas como alternativa al ensayo genético clásico, lo que supone una alternativa muy atractiva para el diagnóstico de enfermedades asociadas a mutaciones genéticas como la fibrosis quística. Además, estas mutaciones se pueden utilizar para trazar patrones de herencia genética asociados con enfermedades específicas [Wilentz, 1998].

Conclusiones

Conclusions

---





## Conclusiones

En esta sección se recogen las conclusiones más relevantes obtenidas a partir de los resultados expuestos.

- Se ha modificado la superficie de electrodos serigrafiados de oro y de carbono con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) mediante diferentes estrategias y las plataformas resultantes se han caracterizado empleando distintas técnicas. Se ha demostrado que en ambos casos la estrategia que produce mejores resultados es la generación de sales de diazonio a partir de la diazotación de MWCNTs aminados y su electroinjerto sobre la superficie del electrodo.
- La posterior modificación con N,N-bis(3,4-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHS) mejora las propiedades electrocatalíticas de los electrodos nanoestructurados con MWCNTs hacia la oxidación de NADH e hidrazina.
- Se han desarrollado dos sensores basados en estas plataformas nanoestructuradas con MWCNTs y modificadas con 3,4-DHS, uno de NADH utilizando electrodos serigrafiados de oro y otro de hidrazina utilizando electrodos serigrafiados de carbono. En ambos casos se obtuvieron buenos límites de detección, con amplios intervalos lineales y buena reproducibilidad.
- Se ha utilizado el 3,4-DHS como reductor y funcionalizador en la reducción de óxido de grafeno para producir grafeno modificado químicamente (rGO-DHS). Este material se ha caracterizado mediante diferentes técnicas, confirmándose tanto la reducción como la presencia del 3,4-DHS en la superficie del grafeno.
- Electrodos serigrafiados de carbono modificados con rGO-DHS presentan actividad electrocatalítica frente a la oxidación de hidrazina. Se ha desarrollado un sensor para la determinación de este analito que presenta buenas propiedades analíticas.
- También se ha construido un biosensor amperométrico de lactato tras modificar la superficie nanoestructurada con la enzima lactato oxidasa (LOx). El 3,4-DHS que se encuentra modificando al grafeno es capaz de actuar como aceptor de electrones en la oxidación enzimática de lactato, reduciendo así el sobrepotencial necesario para su determinación. El biosensor desarrollado se

- aplicó en la determinación directa de lactato en muestras reales de vino para lo que únicamente fue necesario realizar una dilución de este.
- El 3,4-DHS también se ha empleado con éxito en la síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas (AuNPs-DHS). Este ligando actúa como reductor y estabilizante en la generación de suspensiones coloidales estables en una reacción de un solo paso. Las AuNPs-DHS resultantes se caracterizaron mediante una variedad de técnicas.
  - Una vez depositadas sobre electrodos serigrafiados de carbono, las nanoestructuras AuNPs-DHS presentan un potente efecto electrocatalítico frente a la oxidación de hidrazina y la oxidación y reducción de peróxido de hidrógeno. Se desarrollaron sensores para la detección de ambos analitos y se obtuvieron unas excelentes propiedades analíticas, con unos límites de detección de 22 nM para la oxidación de hidrazina y 0.15 y 0.32  $\mu\text{M}$  para la oxidación y reducción de peróxido, respectivamente, y unos intervalos lineales que llegan hasta 70 mM.
  - La capacidad de detección de peróxido de los electrodos modificados con AuNPs-DHS se empleó en el desarrollo de un biosensor para la determinación de lactato basado en el uso de la enzima LOx. Se obtuvo un límite de detección de 2.6  $\mu\text{M}$  y una gran selectividad, que permitió la determinación de lactato en muestras reales de vino, cerveza y yogur sin más tratamiento que una dilución.
  - Por último, se han sintetizado nanopuntos de carbono (CDs) mediante una simple carbonización térmica de EGTA y Tris. Los CDs sintetizados se caracterizaron óptica y electroquímicamente.
  - Se ha desarrollado un biosensor electroquímico de ADN utilizando electrodos serigrafiados de oro nanoestructurados con los CDs. Los CDs permiten la inmovilización de sondas de ADN no modificadas, manteniendo su capacidad de hibridación. Este biosensor permite, además, la detección de mutaciones genéticas en ADN humano real extraído de células sanguíneas.

## Conclusions

In this section the most remarkable conclusions obtained from the reported results are shown.

- Gold and carbon screen printed electrodes surface was modified with multiple walled carbon nanotubes (MWCNTs) by different strategies and the resulting platforms were characterized using different techniques. It has been demonstrated that in both cases the better resulting strategy was the generation of diazonium salts from the diazotization of aminated MWCNTs and their electrografting onto the electrode surface.
- Subsequent modification with N,N-bis(3,4-dihydroxybenzylidene)-1,2-diaminobenzene (3,4-DHS) results in an improvement of the electrocatalytic properties of the nanostructured electrodes towards NADH and hydrazine oxidation.
- Two sensors were developed based on these MWCNTs nanostructured and 3,4-DHS modified platforms, a NADH one, using gold screen printed electrodes and a hydrazine one, using carbon screen printed electrodes. In both cases, good detection limits were obtained, with wide linear ranges and a good reproducibility.
- 3,4-DHS was used as reductant and functionalizer in the graphene oxide reduction to produce chemically modified graphene (rGO-DHS). This material was characterized by different techniques, confirming both the reduction and the presence of 3,4-DHS onto the graphene surface.
- rGO-DHS modified screen printed electrodes exhibit electrocatalytic activity towards hydrazine oxidation. A sensor for this analyte determination was developed. It shows good analytical properties.
- A lactate amperometric biosensor was also constructed after modifying the nanostructured surface with the enzyme lactate oxidase (LOx). The 3,4-DHS modifying the graphene can act as an electron acceptor in the enzymatic lactate oxidation, thus reducing the overpotential needed for its determination. The developed biosensor was applied in the direct lactate determination in wine real samples for what it was only necessary the dilution of the sample.

- 3,4-DHS was also satisfactory employed in the synthesis of functionalized gold nanoparticles (AuNPs-DHS). This ligand acts as a reductant and stabilizer in the generation of stable colloidal suspensions in a one-step reaction. The resulting AuNPs-DHS were characterized by a variety of techniques.
- Once deposited onto screen printed carbon electrodes, the AuNPs-DHS nanostructures show a potent electrocatalytic effect towards hydrazine oxidation and hydrogen peroxide both oxidation and reduction. Sensors for both analytes were developed and excellent analytical properties were obtained, with detection limits of 22 nM for hydrazine oxidation and 0.15 and 0.32  $\mu\text{M}$  for hydrogen peroxide oxidation and reduction, respectively, and linear ranges up to 70 mM.
- This peroxide detection ability of the AuNPs-DHS modified electrodes was used in the development of a biosensor for the lactate determination based on the use of the LOx enzyme. A 2.6  $\mu\text{M}$  detection limit was obtained and also a great selectivity, enabling the biosensor to determine lactate in wine, beer and yoghurt real samples with a mere dilution as sample treatment.
- Finally, carbon nanodots (CDs) were synthesized by a simple EGTA and Tris thermal carbonization. The synthesized CDs were optically and electrochemically characterized.
- An electrochemical DNA biosensor was developed using CDs nanostructured gold screen printed electrodes. The CDs allow the immobilization of non-modified DNA probes, maintaining their hybridization capability. This biosensor can, as well, detect gene mutations in real human DNA extracted from blood cells.

## Bibliografía

---



- [Abad, 2011] Abad, J.M., Revenga-Parra, M., Garcia, T., Gamero, M., Lorenzo, E., Pariente, F., Interactions of Schiff-base ligands with gold nanoparticles: structural, optical and electrocatalytic studies, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13(13), 5668-5678.
- [Adams, 1963] Adams, J.Q., Thomas, J.R., Electron Paramagnetic Resonance of a Hydrazine Radical Ion, *The Journal of Chemical Physics*, 1963, 39(7), 1904-1906.
- [Adams, 1969] Adams, R.N., *Electrochemistry at Solid Electrodes*, 1969, Marcel Dekker, New York.
- [Adekunle, 2008] Adekunle, A.S., Ozoemena, K.I., Insights into the electro-oxidation of hydrazine at single-walled carbon-nanotube-modified edge-plane pyrolytic graphite electrodes electro-decorated with metal and metal oxide films, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2008, 12(10), 1325-1336.
- [Adekunle, 2010a] Adekunle, A.S., Ozoemena, K.I., Electrocatalytic Oxidation of Diethylaminoethanethiol and Hydrazine at Single-walled Carbon Nanotubes Modified with Prussian Blue Nanoparticles, *Electroanalysis*, 2010, 22(21), 2519-2528.
- [Adekunle, 2010b] Adekunle, A.S., Ozoemena, K.I., Electron transport and electrocatalytic properties of MWCNT/nickel nanocomposites: Hydrazine and diethylaminoethanethiol as analytical probes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2010, 645(1), 41-49.
- [Adenier, 2004] Adenier, A., Chehimi, M.M., Gallardo, I., Pinson, J., Vilà, N., Electrochemical Oxidation of Aliphatic Amines and Their Attachment to Carbon and Metal Surfaces, *Langmuir*, 2004, 20(19), 8243-8253.
- [Adhikari, 2004] Adhikari, B., Majumdar, S., Polymers in sensor applications, *Progress in Polymer Science*, 2004, 29(7), 699-766.
- [Aguila, 2000] Aguila, A., Murray, R.W., Monolayer-Protected Clusters with Fluorescent Dansyl Ligands, *Langmuir*, 2000, 16(14), 5949-5954.
- [Ahmar, 2013] Ahmar, H., Keshipour, S., Hosseini, H., Fakhari, A.R., Shaabani, A., Bagheri, A., Electrocatalytic oxidation of hydrazine at glassy carbon electrode modified with ethylenediamine cellulose immobilized palladium nanoparticles, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2013, 690, 96-103.
- [Ahmed, 2015] Ahmed, G.H.G., Laíño, R.B., Calzón, J.A.G., García, M.E.D., Highly fluorescent carbon dots as nanoprobe for sensitive and selective determination of 4-nitrophenol in surface waters, *Microchimica Acta*, 2015, 182(1), 51-59.
- [Ahour, 2017] Ahour, F., Shamsi, A., Electrochemical label-free and sensitive nanobiosensing of DNA hybridization by graphene oxide modified pencil graphite electrode, *Analytical Biochemistry*, 2017, 532, 64-71.
- [Alegret, 2004] Alegret, S., Valle, M., Merkoçi, A., *Sensores electroquímicos*, 2004, Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- [Alex, 2015] Alex, S., Tiwari, A., Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications-A Review, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015, 15(3), 1869-1894.
- [Allen, 2010] Allen, M.J., Tung, V.C., Kaner, R.B., Honeycomb Carbon: A Review of Graphene, *Chemical Reviews*, 2010, 110(1), 132-145.
- [Allongue, 1997] Allongue, P., Delamar, M., Desbat, B., Fagebaume, O., Hitmi, R., Pinson, J., Savéant, J.M., Covalent Modification of Carbon Surfaces by Aryl Radicals Generated from the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(1), 201-207.



- [Allongue, 2003] Allongue, P., Henry de Villeneuve, C., Cherouvrier, G., Cortès, R., Bernard, M.C., Phenyl layers on H-Si(111) by electrochemical reduction of diazonium salts: monolayer versus multilayer formation, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2003, 550, 161-174.
- [Amanulla, 2017] Amanulla, B., Palanisamy, S., Chen, S.M., Velusamy, V., Chiu, T.W., Chen, T.W., Ramaraj, S.K., A non-enzymatic amperometric hydrogen peroxide sensor based on iron nanoparticles decorated reduced graphene oxide nanocomposite, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 487, 370-377.
- [Ameen, 2012] Ameen, S., Akhtar, M.S., Shin, H.S., Hydrazine chemical sensing by modified electrode based on *in situ* electrochemically synthesized polyaniline/graphene composite thin film, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 173, 177-183.
- [Amlathe, 1988] Amlathe, S., Gupta, V.K., Spectrophotometric determination of trace amounts of hydrazine in polluted water, *Analyst*, 1988, 113(9), 1481-1483.
- [An, 2010] An, S.J., Zhu, Y., Lee, S.H., Stoller, M.D., Emilsson, T., Park, S., Velamakanni, A., An, J., Ruoff, R.S., Thin Film Fabrication and Simultaneous Anodic Reduction of Deposited Graphene Oxide Platelets by Electrophoretic Deposition, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010, 1(8), 1259-1263.
- [Anazawa, 2002] Anazawa, K., Shimotani, K., Manabe, C., Watanabe, H., Shimizu, M., High-purity carbon nanotubes synthesis method by an arc discharging in magnetic field, *Applied Physics Letters*, 2002, 81(4), 739-741.
- [Andrieux, 1986] Andrieux, C.P., Gallardo, I., Savaent, J.M., Su, K.B., Dissociative electron transfer. Homogeneous and heterogeneous reductive cleavage of the carbon-halogen bond in simple aliphatic halides, *Journal of the American Chemical Society*, 1986, 108(4), 638-647.
- [Ardakani, 2008] Ardakani, M.M., Karimi, M.A., Zare, M.M., Mirdehghan, S.M., Investigation of Electrochemical Behavior of Hydrazine with Alizarin as a Mediator on Glassy Carbon Electrode, *International Journal of Electrochemical Science*, 2008, 3, 246-258.
- [Arrigan, 2004] Arrigan, D.W.M., Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications, *Analyst*, 2004, 129(12), 1157-1165.
- [Aswal, 2009] Aswal, D.K., Koiry, S.P., Jousseme, B., Gupta, S.K., Palacin, S., Yakhmi, J.V., Hybrid molecule-on-silicon nanoelectronics: Electrochemical processes for grafting and printing of monolayers, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2009, 41(3), 325-344.
- [Aswathy Aromal, 2012] Aswathy Aromal, S., Philip, D., Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using tannic acid and its application in catalysis, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2012, 44(7), 1692-1696.
- [Audrezet, 2008] Audrezet, M.P., Dabricot, A., Le Marechal, C., Ferec, C., Validation of High-Resolution DNA Melting Analysis for Mutation Scanning of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2008, 10(5), 424-434.
- [Ávila-Orta, 2009] Ávila-Orta, C.A., Cruz-Delgado, V.J., Neira-Velázquez, M.G., Hernández-Hernández, E., Méndez-Padilla, M.G., Medellín-Rodríguez, F.J., Surface modification of carbon nanotubes with ethylene glycol plasma, *Carbon*, 2009, 47(8), 1916-1921.
- [Azak, 2016] Azak, H., Kurbanoglu, S., Yildiz, H.B., Ozkan, S.A., Electrochemical glucose biosensing via new generation DTP type conducting polymers/gold nanoparticles/glucose oxidase modified electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, 770, 90-97.

- [Azani, 2010] Azani, M.R., Hassanpour, A., Bordbar, A.K., Mehrgardi, M.A., Interaction of calf thymus DNA with N,N'-Bis(3,4-dihydroxybenzylidene)-1,2-diaminobenzene ligands, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2010, 84(13), 2284-2289.
- [Baghayeri, 2016] Baghayeri, M., Amiri, A., Farhadi, S., Development of non-enzymatic glucose sensor based on efficient loading Ag nanoparticles on functionalized carbon nanotubes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 225, 354-362.
- [Bahr, 2002] Bahr, J.L., Tour, J.M., Covalent chemistry of single-wall carbon nanotubes, *Journal of Materials Chemistry*, 2002, 12(7), 1952-1958.
- [Bai, 2009] Bai, H., Xu, Y., Zhao, L., Li, C., Shi, G., Non-covalent functionalization of graphene sheets by sulfonated polyaniline, *Chemical Communications*, 2009, 1667-1669.
- [Bai, 2011] Bai, H., Li, C., Shi, G., Functional Composite Materials Based on Chemically Converted Graphene, *Advanced Materials*, 2011, 23(9), 1089-1115.
- [Baker, 1972] Baker, R.T.K., Barber, M.A., Harris, P.S., Feates, F.S., Waite, R.J., Nucleation and growth of carbon deposits from the nickel catalyzed decomposition of acetylene, *Journal of Catalysis*, 1972, 26(1), 51-62.
- [Baker, 2010] Baker, S.N., Baker, G.A., Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights, *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(38), 6726-6744.
- [Banhart, 2011] Banhart, F., Kotakoski, J., Krasheninnikov, A.V., Structural Defects in Graphene, *ACS Nano*, 2011, 5(1), 26-41.
- [Banks, 2005] Banks, C.E., Davies, T.J., Wildgoose, G.G., Compton, R.G., Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites, *Chemical Communications*, 2005, 829-841.
- [Banks, 2006] Banks, C.E., Ji, X., Crossley, A., Compton, R.G., Understanding the Electrochemical Reactivity of Bamboo Multiwalled Carbon Nanotubes: the Presence of Oxygenated Species at Tube Ends May not Increase Electron Transfer Kinetics, *Electroanalysis*, 2006, 18(21), 2137-2140.
- [Bard, 1985] Bard, A.J., Parsons, R., Jordan, J., Standard potentials in aqueous solution, 1985, Marcel Dekker, New York.
- [Bard, 2001] Bard, A.J., Faulkner, L.R., Electrochemical methods: fundamentals and applications, 2001, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- [Baughman, 2002] Baughman, R.H., Zakhidov, A.A., de Heer, W.A., Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications, *Science*, 2002, 297(5582), 787-792.
- [Becker, 1981] Becker, R.A., Barrows, L.R., Shank, R.C., Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity: dose-response and kinetic characteristics of O 6 -methylguanine and formation and persistence in rats, *Carcinogenesis*, 1981, 2(11), 1181-1188.
- [Belanger, 2011] Belanger, D., Pinson, J., Electrografting: a powerful method for surface modification, *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(7), 3995-4048.
- [Bernard, 2003] Bernard, M.C., Chaussé, A., Cabet-Deliry, E., Chehimi, M.M., Pinson, J., Podvorica, F., Vautrin-UI, C., Organic Layers Bonded to Industrial, Coinage, and Noble Metals through Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Salts, *Chemistry of Materials*, 2003, 15(18), 3450-3462.
- [Berne, 1976] Berne, B.J., Pecora, R., Dynamic light scattering, 1976, Wiley-Interscience, New York.

- [Bianchi, 1962] Bianchi, G., Mazza, F., Mussini, T., Catalytic decomposition of acid hydrogen peroxide solutions on platinum, iridium, palladium and gold surfaces, *Electrochimica Acta*, 1962, 7(4), 457-473.
- [Blaedel, 1976] Blaedel, W.J., Jenkins, R.A., Study of a reagentless lactate electrode, *Analytical Chemistry*, 1976, 48(8), 1240-1247.
- [Blaser, 1990] Blaser, M.J., *Helicobacter pylori* and the Pathogenesis of Gastroduodenal Inflammation, *The Journal of Infectious Diseases*, 1990, 161(4), 626-633.
- [Bleda-Martínez, 2007] Bleda-Martínez, M.J., Morallón, E., Cazorla-Amorós, D., Polyaniline/porous carbon electrodes by chemical polymerisation: Effect of carbon surface chemistry, *Electrochimica Acta*, 2007, 52(15), 4962-4968.
- [Bottini, 2006] Bottini, M., Balasubramanian, C., Dawson, M.I., Bergamaschi, A., Bellucci, S., Mustelin, T., Isolation and Characterization of Fluorescent Nanoparticles from Pristine and Oxidized Electric Arc-Produced Single-Walled Carbon Nanotubes, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110(2), 831-836.
- [Boujtita, 1996] Boujtita, M., Chapleau, M., Murr, N.E., Enzymatic electrode for the determination of L-lactate, *Electroanalysis*, 1996, 8(5), 485-488.
- [Bourlinos, 2008] Bourlinos, A.B., Stassinopoulos, A., Anglos, D., Zboril, R., Karakassides, M., Giannelis, E.P., Surface Functionalized Carbogenic Quantum Dots, *Small*, 2008, 4(4), 455-458.
- [Bravo, 2015] Bravo, I., García-Mendiola, T., Revenga-Parra, M., Pariente, F., Lorenzo, E., Diazonium salt click chemistry based multiwall carbon nanotube electrocatalytic platforms, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 211, 559-568.
- [Brooksby, 2005] Brooksby, P.A., Downard, A.J., Yu, S.S.C., Effect of Applied Potential on Arylmethyl Films Oxidatively Grafted to Carbon Surfaces, *Langmuir*, 2005, 21(24), 11304-11311.
- [Brust, 1994] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Whyman, R., Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1994, 801-802.
- [Brust, 1995] Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Kiely, C., Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1995, 1655-1656.
- [Cai, 2003a] Cai, H., Xu, Y., He, P.G., Fang, Y.Z., Indicator Free DNA Hybridization Detection by Impedance Measurement Based on the DNA-Doped Conducting Polymer Film Formed on the Carbon Nanotube Modified Electrode, *Electroanalysis*, 2003, 15(23-24), 1864-1870.
- [Cai, 2003b] Cai, H., Cao, X., Jiang, Y., He, P., Fang, Y., Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 375(2), 287-293.
- [Campanhã Vicentini, 2016] Campanhã Vicentini, F., Garcia, L.L.C., Figueiredo-Filho, L.C.S., Janegitz, B.C., Fatibello-Filho, O., A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water, *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 84, 17-23.
- [Cao, 1998] Cao, Y., He, X.W., Studies of interaction between Safranin T and double helix DNA by spectral methods, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1998, 54(6), 883-892.

- [Cao, 2003] Cao, J., Wang, Q., Dai, H., Electromechanical Properties of Metallic, Quasimetallic, and Semiconducting Carbon Nanotubes under Stretching, *Physical Review Letters*, 2003, 90(15), 157601.
- [Cao, 2004] Cao, G., Nanostructures and nanomaterials synthesis, properties and applications, 2004, Imperial College Press, London.
- [Cao, 2015] Cao, G.S., Wang, P., Li, X., Wang, Y., Wang, G., Li, J., A sensitive nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanocomposites, *Bulletin of Materials Science*, 2015, 38(1), 163-167.
- [Carlson, 1985] Carlson, B.W., Miller, L.L., Mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes, *Journal of the American Chemical Society*, 1985, 107(2), 479-485.
- [Casero, 2012] Casero, E., Parra-Alfambra, A.M., Petit-Domínguez, M.D., Pariente, F., Lorenzo, E., Alonso, C., Differentiation between graphene oxide and reduced graphene by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), *Electrochemistry Communications*, 2012, 20, 63-66.
- [Casero, 2013] Casero, E., Alonso, C., Vázquez, L., Petit-Domínguez, M.D., Parra-Alfambra, A.M., De la Fuente, M., Merino, P., Álvarez-García, S., De Andrés, A., Pariente, F., Lorenzo, E., Comparative Response of Biosensing Platforms Based on Synthesized Graphene Oxide and Electrochemically Reduced Graphene, *Electroanalysis*, 2013, 25(1), 154-165.
- [Castro, 2014] Castro, A.C.H., França, E.G., De Paula, L.F., Soares, M.M.C.N., Goulart, L.R., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus, *Applied Surface Science*, 2014, 314, 273-279.
- [Ceccato, 2011] Ceccato, M., Bousquet, A., Hinge, M., Pedersen, S.U., Daasbjerg, K., Using a Mediating Effect in the Electroreduction of Aryldiazonium Salts To Prepare Conducting Organic Films of High Thickness, *Chemistry of Materials*, 2011, 23(6), 1551-1557.
- [Chakraborty, 2007] Chakraborty, S., Retna Raj, C., Amperometric biosensing of glutamate using carbon nanotube based electrode, *Electrochemistry Communications*, 2007, 9(6), 1323-1330.
- [Chang, 2014] Chang, S.H., Yeh, M.H., Rick, J., Su, W.N., Liu, D.G., Lee, J.F., Liu, C.C., Hwang, B.J., Bimetallic catalyst of PtIr nanoparticles with high electrocatalytic ability for hydrogen peroxide oxidation, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 190, 55-60.
- [Chaussé, 2002] Chaussé, A., Chehimi, M.M., Karsi, N., Pinson, J., Podvorica, F., Vautrin-UI, C., The Electrochemical Reduction of Diazonium Salts on Iron Electrodes. The Formation of Covalently Bonded Organic Layers and Their Effect on Corrosion, *Chemistry of Materials*, 2002, 14(1), 392-400.
- [Chekin, 2016] Chekin, F., Singh, S.K., Vasilescu, A., Dhavale, V.M., Kurungot, S., Boukherroub, R., Szunerits, S., Reduced Graphene Oxide Modified Electrodes for Sensitive Sensing of Gliadin in Food Samples, *ACS Sensors*, 2016, 1(12), 1462-1470.
- [Chen, 1998] Chen, E.S., Chen, E.C.M., A proposed model for electron conduction in DNA based upon pairwise anion  $\pi$  stacking: electron affinities and ionization potentials of the hydrogen bonded base pairs, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998, 46(1), 15-19.
- [Chen, 1999] Chen, S., Kimura, K., Synthesis and Characterization of Carboxylate-Modified Gold Nanoparticle Powders Dispersible in Water, *Langmuir*, 1999, 15(4), 1075-1082.

- [Chen, 2001a] Chen, W., Cai, W.P., Liang, C.H., Zhang, L.D., Synthesis of gold nanoparticles dispersed within pores of mesoporous silica induced by ultrasonic irradiation and its characterization, *Materials Research Bulletin*, 2001, 36(1), 335-342.
- [Chen, 2001b] Chen, J.H., Huang, Z.P., Wang, D.Z., Yang, S.X., Li, W.Z., Wen, J.G., Ren, Z.F., Electrochemical synthesis of polypyrrole films over each of well-aligned carbon nanotubes, *Synthetic Metals*, 2001, 125(3), 289-294.
- [Chen, 2004] Chen, J., Bao, J., Cai, C., Lu, T., Electrocatalytic oxidation of NADH at an ordered carbon nanotubes modified glassy carbon electrode, *Analytica Chimica Acta*, 2004, 516(1), 29-34.
- [Chen, 2013a] Chen, Q.L., Wang, C.F., Chen, S., One-step synthesis of yellow-emitting carbogenic dots toward white light-emitting diodes, *Journal of Materials Science*, 2013, 48(6), 2352-2357.
- [Chen, 2013b] Chen, K., Zhang, Z.L., Liang, Y.M., Liu, W., A Graphene-Based Electrochemical Sensor for Rapid Determination of Phenols in Water, *Sensors*, 2013, 13(5), 6204-6216.
- [Chen, 2015] Chen, L., Li, Y., Gu, W., Synthesis of Carbon Dots by Microwave Pyrolysis of Polyol in the Presence of Inorganic Ions, *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 2015, 7(1), 6-9.
- [Chen, 2017] Chen, H., Liu, C., Xia, Y., One-step synthesis of boronic acid functionalized gold nanoclusters for photoluminescence sensing of, *Methods and Applications in Fluorescence*, 2017, 5(1), 014006.
- [Chung, 2011] Chung, D.J., Kim, K.C., Choi, S.H., Electrochemical DNA biosensor based on avidin–biotin conjugation for influenza virus (type A) detection, *Applied Surface Science*, 2011, 257(22), 9390-9396.
- [Cialla, 2014] Cialla, D., Pollok, S., Steinbrücker, C., Weber, K., Popp, J., SERS-based detection of biomolecules, *Nanophotonics*, 2014, 3(6), 383-411.
- [Ciszewski, 2000] Ciszewski, A., Milczarek, G., Electrocatalysis of NADH Oxidation with an Electropolymerized Film of 1,4-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dimethylbutane, *Analytical Chemistry*, 2000, 72(14), 3203-3209.
- [Cliffel, 2000] Cliffel, D.E., Zamborini, F.P., Gross, S.M., Murray, R.W., Mercaptoammonium-Monolayer-Protected, Water-Soluble Gold, Silver, and Palladium Clusters, *Langmuir*, 2000, 16(25), 9699-9702.
- [Coates, 2013] Coates, M., Nyokong, T., Characterization of glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and iron phthalocyanine through grafting and click chemistry, *Electrochimica Acta*, 2013, 91, 158-165.
- [Cobley, 2011] Cobley, C.M., Chen, J., Cho, E.C., Wang, L.V., Xia, Y., Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(1), 44-56.
- [Collins, 1994] Collins, G.E., Rose-Pehrsson, S.L., Fluorescent detection of hydrazine, monomethylhydrazine, and 1,1-dimethylhydrazine by derivatization with aromatic dicarbaldehydes, *Analyst*, 1994, 119(8), 1907-1913.
- [Combellas, 2005] Combellas, C., Delamar, M., Kanoufi, F., Pinson, J., Podvorica, F.I., Spontaneous Grafting of Iron Surfaces by Reduction of Aryldiazonium Salts in Acidic or Neutral Aqueous Solution. Application to the Protection of Iron against Corrosion, *Chemistry of Materials*, 2005, 17(15), 3968-3975.

- [Conant, 1924] Conant, J.B., Fieser, L.F., Reduction potentials of quinones. II. The potentials of certain derivatives of benzoquinone, naphthoquinone and anthraquinone, *Journal of the American Chemical Society*, 1924, 46(8), 1858-1881.
- [Corbierre, 2004] Corbierre, M.K., Cameron, N.S., Lennox, R.B., Polymer-Stabilized Gold Nanoparticles with High Grafting Densities, *Langmuir*, 2004, 20(7), 2867-2873.
- [Cote, 2009] Cote, L.J., Cruz-Silva, R., Huang, J., Flash Reduction and Patterning of Graphite Oxide and Its Polymer Composite, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(31), 11027-11032.
- [Cui, 2003] Cui, J., Burghard, M., Kern, K., Reversible Sidewall Osmylation of Individual Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, 2003, 3(5), 613-615.
- [D'Amour, 2003] D'Amour, M., Bélanger, D., Stability of Substituted Phenyl Groups Electrochemically Grafted at Carbon Electrode Surface, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107(20), 4811-4817.
- [Daniel, 2004] Daniel, M.C., Astruc, D., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 2004, 104(1), 293-346.
- [Darder, 1999] Darder, M., Takada, K., Pariente, F., Lorenzo, E., Abruña, H.D., Dithiobissuccinimidyl Propionate as an Anchor for Assembling Peroxidases at Electrodes Surfaces and Its Application in a  $\text{H}_2\text{O}_2$  Biosensor, *Analytical Chemistry*, 1999, 71(24), 5530-5537.
- [Das, 2008] Das, J., Patra, S., Yang, H., Enhancement of the electrocatalytic activity of gold nanoparticles via  $\text{NaBH}_4$  treatment, *Chemical Communications*, 2008, 4451-4453.
- [Das, 2013] Das, S., Roy, P., Mondal, S., Bera, T., Mukherjee, A., One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 107, 27-34.
- [Dawson, 2000] Dawson, A., Kamat, P.V., Complexation of Gold Nanoparticles with Radiolytically Generated Thiocyanate Radicals ( $(\text{SCN})_2^{\cdot-}$ ), *The Journal of Physical Chemistry B*, 2000, 104(50), 11842-11846.
- [De, 2013] De, B., Karak, N., A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice, *RSC Advances*, 2013, 3(22), 8286-8290.
- [De Backer, 1997] De Backer, D., Creteur, J., Zhang, H., Norrenberg, M., Vincent, J.L., Lactate Production by the Lungs in Acute Lung Injury, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1997, 156(4), 1099-1104.
- [de Toledo, 2015] de Toledo, T.A., Pizani, P.S., da Silva, L.E., Teixeira, A.M.R., Freire, P.T.C., Spectroscopy studies on Schiff base N,N'-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine by NMR, infrared, Raman and DFT calculations, *Journal of Molecular Structure*, 2015, 1097, 106-111.
- [Defever, 2006] Defever, T., Deniau, G., Palacin, S., Goux-capes, L., Barrau, S., Mayne-l'hermite, M., Bourgoïn, J.P., Cathodic electropolymerization on the surface of carbon nanotubes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2006, 589(1), 46-51.
- [del Pozo, 2005a] del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E., Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(8), 1549-1558.

- [del Pozo, 2005b] del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E., DNA Biosensor for Detection of *Helicobacter pylori* Using Phen-dione as the Electrochemically Active Ligand in Osmium Complexes, *Analytical Chemistry*, 2005, 77(8), 2550-2557.
- [Delamar, 1992] Delamar, M., Hitmi, R., Pinson, J., Saveant, J.M., Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(14), 5883-5884.
- [Dequaire, 2000] Dequaire, M., Degrand, C., Limoges, B., An Electrochemical Metalloimmunoassay Based on a Colloidal Gold Label, *Analytical Chemistry*, 2000, 72(22), 5521-5528.
- [Dey, 2013] Dey, R.S., Raj, C.R., Redox-Functionalized Graphene Oxide Architecture for the Development of Amperometric Biosensing Platform, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2013, 5(11), 4791-4798.
- [Diao, 2002] Diao, P., Liu, Z., Wu, B., Nan, X., Zhang, J., Wei, Z., Chemically Assembled Single-Wall Carbon Nanotubes and their Electrochemistry, *ChemPhysChem*, 2002, 3(10), 898-991.
- [Diao, 2010] Diao, P., Liu, Z., Vertically Aligned Single-Walled Carbon Nanotubes by Chemical Assembly – Methodology, Properties, and Applications, *Advanced Materials*, 2010, 22(13), 1430-1449.
- [Dong, 2010] Dong, Y., Zhou, N., Lin, X., Lin, J., Chi, Y., Chen, G., Extraction of Electrochemiluminescent Oxidized Carbon Quantum Dots from Activated Carbon, *Chemistry of Materials*, 2010, 22(21), 5895-5899.
- [Dong, 2013] Dong, Y., Pang, H., Yang, H.B., Guo, C., Shao, J., Chi, Y., Li, C.M., Yu, T., Carbon-Based Dots Co-doped with Nitrogen and Sulfur for High Quantum Yield and Excitation-Independent Emission, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(30), 7800-7804.
- [Doty, 1955] Doty, P., Rice, S.A., The denaturation of desoxypentose nucleic acid, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1955, 16, 446-448.
- [Downard, 2000] Downard, A.J., Electrochemically Assisted Covalent Modification of Carbon Electrodes, *Electroanalysis*, 2000, 12(14), 1085-1096.
- [Dreyer, 2010] Dreyer, D.R., Park, S., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S., The chemistry of graphene oxide, *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(1), 228-240.
- [D'Souza, 2016] D'Souza, O.J., Mascarenhas, R.J., Satpati, A.K., Aiman, L.V., Mekhalif, Z., Electrocatalytic oxidation of l-tyrosine at carboxylic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes modified carbon paste electrode, *Ionics*, 2016, 22(3), 405-414.
- [Dubois, 1992] Dubois, L.H., Nuzzo, R.G., Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces, *Annual Review of Physical Chemistry*, 1992, 43(1), 437-463.
- [Dutta, 2012] Dutta, A.K., Maji, S.K., Srivastava, D.N., Mondal, A., Biswas, P., Paul, P., Adhikary, B., Peroxidase-like activity and amperometric sensing of hydrogen peroxide by Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Prussian Blue-modified Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2012, 360, 71-77.
- [Eatemadi, 2014] Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., Abasi, M., Hanifehpour, Y., Joo, S.W., Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications, *Nanoscale Research Letters*, 2014, 9(1), 393.

- [Eda, 2008] Eda, G., Fanchini, G., Chhowalla, M., Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material, *Nature Nanotechnology*, 2008, 3(5), 270-274.
- [Eda, 2010] Eda, G., Chhowalla, M., Chemically Derived Graphene Oxide: Towards Large-Area Thin-Film Electronics and Optoelectronics, *Advanced Materials*, 2010, 22(22), 2392-2415.
- [Edgar, 2012] Edgar, J.A., McDonagh, A.M., Cortie, M.B., Formation of Gold Nanorods by a Stochastic "Popcorn" Mechanism, *ACS Nano*, 2012, 6(2), 1116-1125.
- [Eguílaz, 2016] Eguílaz, M., Gutierrez, F., González-Domínguez, J.M., Martínez, M.T., Rivas, G., Single-walled carbon nanotubes covalently functionalized with polytyrosine: A new material for the development of NADH-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86, 308-314.
- [Elbert, 1996] Elbert, D.L., Hubbell, J.A., Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility, *Annual Review of Materials Science*, 1996, 26(1), 365-394.
- [Elias, 2006] Elias, G., Bauer, W.F., Hydrazine determination in sludge samples by high-performance liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 2006, 29(3), 460-464.
- [Encinas, 1996] Encinas, M.V., Rufs, A.M., Neumann, M.G., Previtali, C.M., Photoinitiated vinyl polymerization by safranin T/triethanolamine in aqueous solution, *Polymer*, 1996, 37(8), 1395-1398.
- [Ensafi, 2011] Ensafi, A.A., Taei, M., Rahmani, H.R., Khayamian, T., Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode, *Electrochimica Acta*, 2011, 56(24), 8176-8183.
- [Ensafi, 2012] Ensafi, A.A., Lotfi, M., Karimi-Maleh, H., New Modified-Multiwall Carbon Nanotubes Paste Electrode for Electrocatalytic Oxidation and Determination of Hydrazine Using Square Wave Voltammetry, *Chinese Journal of Catalysis*, 2012, 33(2), 487-493.
- [Enyashin, 2007] Enyashin, A.N., Gemming, S., Seifert, G., DNA-wrapped carbon nanotubes, *Nanotechnology*, 2007, 18(24), Article ID 245702.
- [Erçarıkcı, 2014] Erçarıkcı, E., Dağcı, K., Topçu, E., Alanyalıoğlu, M., Electrochemical preparation of poly(methylene blue)/graphene nanocomposite thin films, *Materials Research Bulletin*, 2014, 55, 95-101.
- [Erdem, 2001] Erdem, A., Ozsoz, M., Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Analytica Chimica Acta*, 2001, 437(1), 107-114.
- [Ertek, 2016] Ertek, B., Dilgin, Y., Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite electrode, *Bioelectrochemistry*, 2016, 112, 138-144.
- [Esumi, 1996] Esumi, K., Ishigami, M., Nakajima, A., Sawada, K., Honda, H., Chemical treatment of carbon nanotubes, *Carbon*, 1996, 34(2), 279-281.
- [Fajkus, 2002] Fajkus, M., Hianik, T., Peculiarities of the DNA hybridization on the surface of bilayer lipid membranes, *Talanta*, 2002, 56(5), 895-903.
- [Fakhari, 2015] Fakhari, A.R., Ahmar, H., Hosseini, H., Kazemi Movahed, S., Fabrication of novel redox-active poly (4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-ylsulfanyl-3-methyl-1,2-benzenediol)-gold nanoparticles film on MWCNTs modified electrode: Application as the electrochemical sensor for the determination of hydrazine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 213, 82-91.



- [Fan, 2008] Fan, X., Peng, W., Li, Y., Li, X., Wang, S., Zhang, G., Zhang, F., Deoxygenation of Exfoliated Graphite Oxide under Alkaline Conditions: A Green Route to Graphene Preparation, *Advanced Materials*, 2008, 20(23), 4490-4493.
- [Fanjul-Bolado, 2007] Fanjul-Bolado, P., Queipo, P., Lamas-Ardisana, P.J., Costa-García, A., Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools, *Talanta*, 2007, 74(3), 427-433.
- [Fellah, 2002] Fellah, S., Teyssot, A., Ozanam, F., Chazalviel, J.N., Vigneron, J., Etcheberry, A., Kinetics of Electrochemical Derivatization of the Silicon Surface by Grignards, *Langmuir*, 2002, 18(15), 5851-5860.
- [Fellah, 2006] Fellah, S., Ozanam, F., Chazalviel, J.N., Vigneron, J., Etcheberry, A., Stchakovsky, M., Grafting and Polymer Formation on Silicon from Unsaturated Grignards: I-Aromatic Precursors, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110(4), 1665-1672.
- [Ferapontova, 2011] Ferapontova, E.E., Electrochemical Indicators for DNA Electroanalysis, *Current Analytical Chemistry*, 2011, 7(1), 51-62.
- [Fernández-Merino, 2010] Fernández-Merino, M.J., Guardia, L., Paredes, J.I., Villar-Rodil, S., Solís-Fernández, P., Martínez-Alonso, A., Tascón, J.M.D., Vitamin C Is an Ideal Substitute for Hydrazine in the Reduction of Graphene Oxide Suspensions, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010, 114(14), 6426-6432.
- [Ferrari, 2000] Ferrari, A.C., Robertson, J., Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon, *Physical Review B*, 2000, 61(20), 14095-14107.
- [Filip, 2011] Filip, J., Šefčovičová, J., Tomčík, P., Gemeiner, P., Tkac, J., A hyaluronic acid dispersed carbon nanotube electrode used for a mediatorless NADH sensing and biosensing, *Talanta*, 2011, 84(2), 355-361.
- [Fitzer, 1987] Fitzer, E., Weiss, R., Effect of surface treatment and sizing of c-fibres on the mechanical properties of cfr thermosetting and thermoplastic polymers, *Carbon*, 1987, 25(4), 455-467.
- [Flavel, 2010] Flavel, B.S., Garrett, D.J., Lehr, J., Shapter, J.G., Downard, A.J., Chemically immobilised carbon nanotubes on silicon: Stable surfaces for aqueous electrochemistry, *Electrochimica Acta*, 2010, 55(12), 3995-4001.
- [Florea, 2015] Florea, A., Cristea, C., Vocanson, F., Săndulescu, R., Jaffrezic-Renault, N., Electrochemical sensor for the detection of estradiol based on electropolymerized molecularly imprinted polythioaniline film with signal amplification using gold nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 2015, 59, 36-39.
- [Foster, 2000] Foster, R., Cassidy, J., O'Donoghue, E., Electrochemical Diagnostic Strip Device for Total Cholesterol and Its Subfractions, *Electroanalysis*, 2000, 12(9), 716-721.
- [Foster, 2014] Foster, C.W., Metters, J.P., Kampouris, D.K., Banks, C.E., Ultraflexible Screen-Printed Graphitic Electroanalytical Sensing Platforms, *Electroanalysis*, 2014, 26(2), 262-274.
- [Frens, 1973] Frens, G., Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature Physical Science*, 1973, 241(105), 20-22.
- [Frisch, 2009] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J.A.J., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J.,

- Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, O., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., Gaussian 09, Revision A.02, 2009, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [Fu, 2015] Fu, X.C., Zhang, J., Tao, Y.Y., Wu, J., Xie, C.G., Kong, L.T., Three-dimensional mono-6-thio- $\beta$ -cyclodextrin covalently functionalized gold nanoparticle/single-wall carbon nanotube hybrids for highly sensitive and selective electrochemical determination of methyl parathion, *Electrochimica Acta*, 2015, 153, 12-18.
- [Galli, 1988] Galli, C., Radical reactions of arenediazonium ions: An easy entry into the chemistry of the aryl radical, *Chemical Reviews*, 1988, 88(5), 765-792.
- [Galus, 1991] Galus, Z., Fundamentals of Electrochemical Analysis, 1991, Ellis Horwood.
- [Gamella, 2010] Gamella, M., Campuzano, S., Conzuelo, F., Curiel, J.A., Muñoz, R., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., Integrated multienzyme electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in wines, *Talanta*, 2010, 81(3), 925-933.
- [Gamero, 2010] Gamero, M., Pariente, F., Lorenzo, E., Alonso, C., Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(9), 2038-2044.
- [Ganesh, 2012] Ganesh, S., Khan, F., Ahmed, M.K., Velavendan, P., Pandey, N.K., Mudali, U.K., Developed New Procedure for Low Concentrations of Hydrazine Determination by Spectrophotometry: Hydrazine-Potassium Permanganate System, *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 2012, 2(2), 98-102.
- [Gao, 1990] Gao, X., Davies, J.P., Weaver, M.J., Test of surface selection rules for surface-enhanced Raman scattering: the orientation of adsorbed benzene and monosubstituted benzenes on gold, *The Journal of Physical Chemistry*, 1990, 94(17), 6858-6864.
- [Gao, 2000] Gao, M., Huang, S., Dai, L., Wallace, G., Gao, R., Wang, Z., Aligned Coaxial Nanowires of Carbon Nanotubes Sheathed with Conducting Polymers, *Angewandte Chemie*, 2000, 112(20), 3810-3813.
- [Gao, 2009] Gao, W., Alemany, L.B., Ci, L., Ajayan, P.M., New insights into the structure and reduction of graphite oxide, *Nature Chemistry*, 2009, 1(5), 403-408.
- [Gao, 2015] Gao, H., Duan, H., 2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 65, 404-419.
- [García, 2008a] García, T., Revenga-Parra, M., Abruña, H.D., Pariente, F., Lorenzo, E., Single-Mismatch Position-Sensitive Detection of DNA Based on a Bifunctional Ruthenium Complex, *Analytical Chemistry*, 2008, 80(1), 77-84.
- [García, 2008b] García, T., Casero, E., Revenga-Parra, M., Pariente, F., Lorenzo, E., Dual-Stage DNA Sensing: Recognition and Detection, *Analytical Chemistry*, 2008, 80(24), 9443-9449.
- [García Marín, 2016] García Marín, A., García-Mendiola, T., Bernabeu, C.N., Hernandez, M.J., Piqueras, J., Pau, J.L., Pariente, F., Lorenzo, E., Gallium plasmonic nanoparticles for label-free DNA and single nucleotide polymorphism sensing, *Nanoscale*, 2016, 8(18), 9842-9851.
- [García-Mendiola, 2014] García-Mendiola, T., Barreiro Martínez, T., Pariente, F., Molano, J., Lorenzo, E., Screening of Specific Gene Mutations Associated with Cystic Fibrosis, *Electroanalysis*, 2014, 26(6), 1362-1372.

- [García-Mendiola, 2016] García-Mendiola, T., Cerro, M.R., López-Moreno, J.M., Pariente, F., Lorenzo, E., Dyes as bifunctional markers of DNA hybridization on surfaces and mutation detection, *Bioelectrochemistry*, 2016, 111, 115-122.
- [Gasnier, 2012] Gasnier, A., Pedano, M.L., Gutierrez, F., Labbé, P., Rivas, G.A., Rubianes, M.D., Glassy carbon electrodes modified with a dispersion of multi-wall carbon nanotubes in dopamine-functionalized polyethylenimine: Characterization and analytical applications for nicotinamide adenine dinucleotide quantification, *Electrochimica Acta*, 2012, 71, 73-81.
- [Geim, 2007] Geim, A.K., Novoselov, K.S., The rise of graphene, *Nature Materials*, 2007, 6(3), 183-191.
- [Geng, 2008] Geng, Y., Liu, M.Y., Li, J., Shi, X.M., Kim, J.K., Effects of surfactant treatment on mechanical and electrical properties of CNT/epoxy nanocomposites, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 2008, 39(12), 1876-1883.
- [Georgakilas, 2007] Georgakilas, V., Gournis, D., Tzitzios, V., Pasquato, L., Guldi, D.M., Prato, M., Decorating carbon nanotubes with metal or semiconductor nanoparticles, *Journal of Materials Chemistry*, 2007, 17(26), 2679-2694.
- [Georgakilas, 2012] Georgakilas, V., Otyepka, M., Bourlinos, A.B., Chandra, V., Kim, N., Kemp, K.C., Hobza, P., Zboril, R., Kim, K.S., Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications, *Chemical Reviews*, 2012, 112(11), 6156-6214.
- [Georgakilas, 2015] Georgakilas, V., Perman, J.A., Tucek, J., Zboril, R., Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures, *Chemical Reviews*, 2015, 115(11), 4744-4822.
- [Gholizadeh, 2012] Gholizadeh, A., Shahrokhian, S., Irajizad, A., Mohajerzadeh, S., Vosoughi, M., Darbari, S., Koohsorkhi, J., Mehran, M., Fabrication of Sensitive Glutamate Biosensor Based on Vertically Aligned CNT Nanoelectrode Array and Investigating the Effect of CNTs density on the electrode performance, *Analytical Chemistry*, 2012, 84(14), 5932-5938.
- [Ghosh, 2008] Ghosh, S., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Pokatilov, E.P., Nika, D.L., Balandin, A.A., Bao, W., Miao, F., Lau, C.N., Extremely high thermal conductivity of graphene: Prospects for thermal management applications in nanoelectronic circuits, *Applied Physics Letters*, 2008, 92(15), 151911.
- [Gojny, 2004] Gojny, F.H., Wichmann, M.H.G., Köpke, U., Fiedler, B., Schulte, K., Carbon nanotube-reinforced epoxy-composites: enhanced stiffness and fracture toughness at low nanotube content, *Composites Science and Technology*, 2004, 64(15), 2363-2371.
- [Golabi, 1999a] Golabi, S.M., Zare, H.R., Electrocatalytic Oxidation of Hydrazine at Glassy Carbon Electrode Modified with Electrodeposited Film Derived from Caffeic Acid, *Electroanalysis*, 1999, 11(17), 1293-1300.
- [Golabi, 1999b] Golabi, S.M., Zare, H.R., Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a chlorogenic acid (CGA) modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1999, 465(2), 168-176.
- [Golabi, 2001] Golabi, S.M., Zare, H.R., Hamzehloo, M., Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a pyrocatechol violet (PCV) chemically modified electrode, *Microchemical Journal*, 2001, 69(2), 13-23.
- [Gómez-Anquela, 2014] Gómez-Anquela, C., Revenga-Parra, M., Abad, J.M., Marín, A.G., Pau, J.L., Pariente, F., Piqueras, J., Lorenzo, E., Electrografting of N,N'-dimethylphenothiazin-5-

- ium-3,7-diamine (Azure A) diazonium salt forming electrocatalytic organic films on gold or graphene oxide gold hybrid electrodes, *Electrochimica Acta*, 2014, 116, 59-68.
- [Gómez-Anquela, 2015] Gómez-Anquela, C., García-Mendiola, T., Abad, J.M., Pita, M., Pariente, F., Lorenzo, E., Scaffold electrodes based on thioctic acid-capped gold nanoparticles coordinated Alcohol Dehydrogenase and Azure A films for high performance biosensor, *Bioelectrochemistry*, 2015, 106, 335-342.
- [Gooding, 2003] Gooding, J.J., Wibowo, R., Liu, J., Yang, W., Losic, D., Orbons, S., Mearns, F.J., Shapter, J.G., Hibbert, D.B., Protein Electrochemistry Using Aligned Carbon Nanotube Arrays, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(30), 9006-9007.
- [Gooding, 2005] Gooding, J.J., Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing, *Electrochimica Acta*, 2005, 50(15), 3049-3060.
- [Goran, 2011] Goran, J.M., Lyon, J.L., Stevenson, K.J., Amperometric Detection of L-Lactate Using Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes Modified with Lactate Oxidase, *Analytical Chemistry*, 2011, 83(21), 8123-8129.
- [Goszner, 1974] Goszner, K., Bischof, H., The decomposition of hydrogen peroxide on silver-gold alloys, *Journal of Catalysis*, 1974, 32(2), 175-182.
- [Grieffs, 1858] Grieffs, P., Vorläufige Notiz über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Amidinitro- und Aminitrophenylsäure, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1858, 106(1), 123-125.
- [Griffin, 2007] Griffin, F., Fitzmaurice, D., Preparation and Thermally Promoted Ripening of Water-Soluble Gold Nanoparticles Stabilized by Weakly Physisorbed Ligands, *Langmuir*, 2007, 23(20), 10262-10271.
- [Grzybowska-Świerkosz, 2006] Grzybowska-Świerkosz, B., Nano-Au/oxide support catalysts in oxidation reactions: Provenance of active oxygen species, *Catalysis Today*, 2006, 112(1), 3-7.
- [Gu, 2017] Gu, S., Ma, K., Kong, J., Al-Ghanim, K.A., Mahboob, S., Liu, Y., Zhang, X., Functionalized Polyethyleneimine-gold Nanoparticles-Porphyrin Nanocomposite for Electrochemical Glucose Biosensing, *International Journal of Electrochemical Science*, 2017, 12(6), 5092-5103.
- [Haccoun, 2004] Haccoun, J., Piro, B., Tran, L.D., Dang, L.A., Pham, M.C., Reagentless amperometric detection of L-lactate on an enzyme-modified conducting copolymer poly(5-hydroxy-1,4-naphthoquinone-co-5-hydroxy-3-thioacetic acid-1,4-naphthoquinone), *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19(10), 1325-1329.
- [Haiss, 2007] Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., Fernig, D.G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra, *Analytical Chemistry*, 2007, 79(11), 4215-4221.
- [Hallaj, 2016] Hallaj, R., Salimi, A., Kavosi, B., Mansouri, G., Highly sensitive and ultra-selective amperometric nitrite sensor using cyclometalated Rh(III)-complex/CNTs modified glassy carbon electrode integrated with flow injection analysis, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 233, 107-119.
- [Harris, 2007] Harris, D.C., Berenguer Navarro, V., Análisis químico cuantitativo, 2007, 3era ed. Reverté, Barcelona.
- [Hashimoto, 1994] Hashimoto, K., Ito, K., Ishimori, Y., Sequence-Specific Gene Detection with a Gold Electrode Modified with DNA Probes and an Electrochemically Active Dye, *Analytical Chemistry*, 1994, 66(21), 3830-3833.

- [Hashimoto, 1998] Hashimoto, K., Ito, K., Ishimori, Y., Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1998, 46(3), 220-225.
- [Hassan, 2015] Hassan, S.S., Nafady, A., Sirajuddin, Solangi, A.R., Kalhor, M.S., Abro, M.I., Sherazi, S.T.H., Ultra-trace level electrochemical sensor for methylene blue dye based on nafion stabilized ibuprofen derived gold nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 208, 320-326.
- [He, 2005] He, P., Xu, Y., Fang, Y., Applications of Carbon Nanotubes in Electrochemical DNA Biosensors, *Microchimica Acta*, 2005, 152(3), 175.
- [He, 2010] He, S., Song, B., Li, D., Zhu, C., Qi, W., Wen, Y., Wang, L., Song, S., Fang, H., Fan, C., A Graphene Nanoprobe for Rapid, Sensitive, and Multicolor Fluorescent DNA Analysis, *Advanced Functional Materials*, 2010, 20(3), 453-459.
- [Heli, 2007] Heli, H., Moosavi-Movahedi, A.A., Jabbari, A., Ahmad, F., An electrochemical study of safranin O binding to DNA at the surface, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2007, 11(5), 593-599.
- [Henglein, 1998] Henglein, A., Meisel, D., Radiolytic Control of the Size of Colloidal Gold Nanoparticles, *Langmuir*, 1998, 14(26), 7392-7396.
- [Hernandez, 2008] Hernandez, Y., Nicolosi, V., Lotya, M., Blighe, F.M., Sun, Z., De, S., McGovern, T., Holland, B., Byrne, M., Gun'Ko, Y.K., Boland, J.J., Niraj, P., Duesberg, G., Krishnamurthy, S., Goodhue, R., Hutchison, J., Scardaci, V., Ferrari, A.C., Coleman, J.N., High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite, *Nature Nanotechnology*, 2008, 3(9), 563-568.
- [Hernández, 2005] Hernández, J., Solla-Gullón, J., Herrero, E., Aldaz, A., Feliu, J.M., Characterization of the Surface Structure of Gold Nanoparticles and Nanorods Using Structure Sensitive Reactions, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109(26), 12651-12654.
- [Hernández-Santos, 2004] Hernández-Santos, D., Díaz-González, M., González-García, M.B., Costa-García, A., Enzymatic Genosensor on Streptavidin-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes, *Analytical Chemistry*, 2004, 76(23), 6887-6893.
- [Hirsch, 2002] Hirsch, A., Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(11), 1853-1859.
- [Hirsch, 2005] Hirsch, A., Vostrowsky, O., Functionalization of Carbon Nanotubes, 2005, en Schlüter, A.D. (ed.), *Topics in Current Chemistry*, Springer, Berlin, Heidelberg, 245, 193-237.
- [Hoffman, 1991] Hoffman, W.P., Hurley, W.C., Owens, T.W., Phan, H.T., Advantage of the scanning tunnelling microscope in documenting changes in carbon fibre surface morphology brought about by various surface treatments, *Journal of Materials Science*, 1991, 26(17), 4545-4553.
- [Horcas, 2007] Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baro, A.M., WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Review of Scientific Instruments*, 2007, 78(1), 013705.
- [Hoshyar, 2016] Hoshyar, R., Khayati, G.R., Poorgholami, M., Kaykhaii, M., A novel green one-step synthesis of gold nanoparticles using crocin and their anti-cancer activities, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 159, 237-242.

- [Hou, 2015] Hou, Y., Lu, Q., Deng, J., Li, H., Zhang, Y., One-pot electrochemical synthesis of functionalized fluorescent carbon dots and their selective sensing for mercury ion, *Analytica Chimica Acta*, 2015, 866, 69-74.
- [Hsiou, 2004] Hsiou, Y.F., Yang, Y.J., Stobinski, L., Kuo, W., Chen, C.D., Controlled placement and electrical contact properties of individual multiwalled carbon nanotubes on patterned silicon chips, *Applied Physics Letters*, 2004, 84(6), 984-986.
- [Hu, 2010] Hu, M., Ou, F.S., Wu, W., Naumov, I., Li, X., Bratkovsky, A.M., Williams, R.S., Li, Z., Gold Nanofingers for Molecule Trapping and Detection, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(37), 12820-12822.
- [Hu, 2013] Hu, S., Tian, R., Dong, Y., Yang, J., Liu, J., Chang, Q., Modulation and effects of surface groups on photoluminescence and photocatalytic activity of carbon dots, *Nanoscale*, 2013, 5(23), 11665-11671.
- [Huang, 2000] Huang, Z., Korenaga, T., Helaleh, M.I.H., Kinetic Spectrofluorimetric Determination of Nitrite in Water Samples and Nitrogen Dioxide in the Atmosphere Sampled by the Liquid Droplet Method, *Microchimica Acta*, 2000, 134(3), 179-183.
- [Huang, 2002] Huang, T.J., Liu, M., Knight, L.D., Grody, W.W., Miller, J.F., Ho, C.M., An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes, *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(12), e55-e55.
- [Huang, 2006] Huang, W., Qian, W., El-Sayed, M.A., Gold Nanoparticles Propulsion from Surface Fueled by Absorption of Femtosecond Laser Pulse at Their Surface Plasmon Resonance, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(41), 13330-13331.
- [Huang, 2007] Huang, M., Jiang, H., Zhai, J., Liu, B., Dong, S., A simple route to incorporate redox mediator into carbon nanotubes/Nafion composite film and its application to determine NADH at low potential, *Talanta*, 2007, 74(1), 132-139.
- [Huang, 2012] Huang, P., Lin, J., Wang, X., Wang, Z., Zhang, C., He, M., Wang, K., Chen, F., Li, Z., Shen, G., Cui, D., Chen, X., Light-Triggered Theranostics Based on Photosensitizer-Conjugated Carbon Dots for Simultaneous Enhanced-Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy, *Advanced Materials*, 2012, 24(37), 5104-5110.
- [Huang, 2013] Huang, J.P.J., Liu, J., Separation of Short Single- and Double-Stranded DNA Based on Their Adsorption Kinetics Difference on Graphene Oxide, *Nanomaterials*, 2013, 3(2), 221-228.
- [Hulanicki, 1991] Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., Chemical sensors: definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry*, 1991, 63(9), 1247-1250.
- [Hummers, 1958] Hummers, W.S., Offeman, R.E., Preparation of Graphitic Oxide, *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(6), 1339-1339.
- [Hurley, 2004] Hurley, B.L., McCreery, R.L., Covalent Bonding of Organic Molecules to Cu and Al Alloy 2024 T3 Surfaces via Diazonium Ion Reduction, *Journal of The Electrochemical Society*, 2004, 151(5), B252-B259.
- [Iijima, 1991] Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 1991, 354(6348), 56-58.
- [Iijima, 1996] Iijima, S., Brabec, C., Maiti, A., Bernholc, J., Structural flexibility of carbon nanotubes, *The Journal of Chemical Physics*, 1996, 104(5), 2089-2092.

- [Ipe, 2002] Ipe, B.I., Thomas, K.G., Barazzouk, S., Hotchandani, S., Kamat, P.V., Photoinduced Charge Separation in a Fluorophore–Gold Nanoassembly, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(1), 18-21.
- [Isaacs, 1998] Isaacs, M., Aguirre, M.J., Toro-Labbé, A., Costamagna, J., Páez, M., Zagal, J.H., Comparative study of the electrocatalytic activity of cobalt phthalocyanine and cobalt naphthalocyanine for the reduction of oxygen and the oxidation of hydrazine, *Electrochimica Acta*, 1998, 43(12–13), 1821-1827.
- [Ishtchenko, 2003] Ishtchenko, V.V., Huddersman, K.D., Vitkovskaya, R.F., Part 1. Production of a modified PAN fibrous catalyst and its optimisation towards the decomposition of hydrogen peroxide, *Applied Catalysis A: General*, 2003, 242(1), 123-137.
- [Istrate, 2016] Istrate, O.M., Rotariu, L., Bala, C., Electrochemical determination of NADH using screen printed carbon electrodes modified with reduced graphene oxide and poly(allylamine hydrochloride), *Microchimica Acta*, 2016, 183(1), 57-65.
- [Iveković, 2010] Iveković, D., Gajović, A., Čeh, M., Pihlar, B., Prussian Blue-Modified Titanate Nanotubes: A Novel Nanostructured Catalyst for Electrochemical Reduction of Hydrogen Peroxide, *Electroanalysis*, 2010, 22(19), 2202-2210.
- [Iveković, 2012] Iveković, D., Trbić, H.V., Peter, R., Petravić, M., Čeh, M., Pihlar, B., Enhancement of stability of Prussian blue thin films by electrochemical insertion of  $\text{Ni}^{2+}$  ions: A stable electrocatalytic sensing of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in mild alkaline media, *Electrochimica Acta*, 2012, 78, 452-458.
- [Iwuoha, 1999] Iwuoha, E.I., Rock, A., Smyth, M.R., Amperometric L-Lactate Biosensors: 1. Lactic Acid Sensing Electrode Containing Lactate Oxidase in a Composite Poly-L-lysine Matrix, *Electroanalysis*, 1999, 11(5), 367-373.
- [Jahan, 2013] Jahan, S., Mansoor, F., Naz, S., Lei, J., Kanwal, S., Oxidative Synthesis of Highly Fluorescent Boron/Nitrogen Co-Doped Carbon Nanodots Enabling Detection of Photosensitizer and Carcinogenic Dye, *Analytical Chemistry*, 2013, 85(21), 10232-10239.
- [Jahanbani, 2016] Jahanbani, S., Benvidi, A., A novel electrochemical DNA biosensor based on a modified magnetic bar carbon paste electrode with  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs-reduced graphene oxide/PANHS nanocomposite, *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 68, 1-8.
- [Jain, 2006] Jain, P.K., Lee, K.S., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110(14), 7238-7248.
- [Jana, 2000] Jana, A.K., Solar cells based on dyes, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2000, 132(1–2), 1-17.
- [Jelley, 1936] Jelley, E.E., Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State, *Nature*, 1936, 138(3502), 1009-1010.
- [Jena, 2007] Jena, B.K., Raj, C.R., Synthesis of Flower-like Gold Nanoparticles and Their Electrocatalytic Activity Towards the Oxidation of Methanol and the Reduction of Oxygen, *Langmuir*, 2007, 23(7), 4064-4070.
- [Jiang, 2008] Jiang, S., Deng, J., Yang, W., Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes by Thermo-Grafting with  $\alpha$ -Methylstyrene-Containing Copolymers, *Macromolecular Rapid Communications*, 2008, 29(18), 1521-1526.
- [Jiang, 2010] Jiang, H., Chen, F., Lagally, M.G., Denes, F.S., New Strategy for Synthesis and Functionalization of Carbon Nanoparticles, *Langmuir*, 2010, 26(3), 1991-1995.

- [Jiang, 2014] Jiang, C., Wu, H., Song, X., Ma, X., Wang, J., Tan, M., Presence of photoluminescent carbon dots in Nescafe® original instant coffee: Applications to bioimaging, *Talanta*, 2014, 127, 68-74.
- [Kamat, 1993] Kamat, P.V., Photochemistry on nonreactive and reactive (semiconductor) surfaces, *Chemical Reviews*, 1993, 93(1), 267-300.
- [Kaplan, 1933] Kaplan, M.L., Kaplan, L., The Gram Stain and Differential Staining, *Journal of Bacteriology*, 1933, 25(3), 309-321.
- [Kapuscinski, 1983] Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., Interactions of acridine orange with nucleic acids: Properties of complexes of acridine orange with single stranded ribonucleic acid, *Biochemical Pharmacology*, 1983, 32(24), 3679-3694.
- [Kara, 2002] Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., Label-Free and Label Based Electrochemical Detection of Hybridization by Using Methylene Blue and Peptide Nucleic Acid Probes at Chitosan Modified Carbon Paste Electrodes, *Electroanalysis*, 2002, 14(24), 1685-1690.
- [Karimi-Maleh, 2014] Karimi-Maleh, H., Tahernejad-Javazmi, F., Daryanavard, M., Hadadzadeh, H., Ensafi, A.A., Abbasghorbani, M., Electrocatalytic and Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Folic Acid at Ruthenium(II) Complex-ZnO/CNTs Nanocomposite Modified Carbon Paste Electrode, *Electroanalysis*, 2014, 26(5), 962-970.
- [Kariuki, 1999] Kariuki, J.K., McDermott, M.T., Nucleation and Growth of Functionalized Aryl Films on Graphite Electrodes, *Langmuir*, 1999, 15(19), 6534-6540.
- [Kariuki, 2001] Kariuki, J.K., McDermott, M.T., Formation of Multilayers on Glassy Carbon Electrodes via the Reduction of Diazonium Salts, *Langmuir*, 2001, 17(19), 5947-5951.
- [Karlsson, 1975] Karlsson, J., Willerson, J.T., Leshin, S.J., Mullins, C.B., Mitchell, J.H., Clinical Physiology: Skeletal Muscle Metabolites in Patients with Cardiogenic Shock or Severe Congestive Heart Failure, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 1975, 35(1), 73-79.
- [Karthik, 2013] Karthik, S., Saha, B., Ghosh, S.K., Pradeep Singh, N.D., Photoresponsive quinoline tethered fluorescent carbon dots for regulated anticancer drug delivery, *Chemical Communications*, 2013, 49(89), 10471-10473.
- [Kasibabu, 2015] Kasibabu, B.S.B., D'souza, S.L., Jha, S., Singhal, R.K., Basu, H., Kailasa, S.K., One-step synthesis of fluorescent carbon dots for imaging bacterial and fungal cells, *Analytical Methods*, 2015, 7(6), 2373-2378.
- [Kavita, 2017] Kavita, V., DNA Biosensors-A Review, *Journal of Bioengineering and Biomedical Science*, 2017, 7(2).
- [Kelley, 1997] Kelley, S.O., Barton, J.K., Jackson, N.M., Hill, M.G., Electrochemistry of Methylene Blue Bound to a DNA-Modified Electrode, *Bioconjugate Chemistry*, 1997, 8(1), 31-37.
- [Kelley, 1999] Kelley, S.O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M., Hill, M.G., Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(24), 4830-4837.
- [Kemp, 2005] Kemp, G., Lactate accumulation, proton buffering, and pH change in ischemically exercising muscle, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, 289(3), R895-R901.



- [Kenausis, 1996] Kenausis, G., Taylor, C., Katakis, I., Heller, A., 'Wiring' of glucose oxidase and lactate oxidase within a hydrogel made with poly(vinyl pyridine) complexed with  $[\text{Os}(\text{4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine})_2\text{Cl}]^{+/2+}$ , *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 1996, 92(20), 4131-4136.
- [Kepley, 1988] Kepley, L.J., Bard, A.J., Ellipsometric, electrochemical, and elemental characterization of the surface phase produced on glassy carbon electrodes by electrochemical activation, *Analytical Chemistry*, 1988, 60(14), 1459-1467.
- [Khan, 1997] Khan, G.F., Wernet, W., Design of Enzyme Electrodes for Extended Use and Storage Life, *Analytical Chemistry*, 1997, 69(14), 2682-2687.
- [Khan, 2014a] Khan, A.Y., Saha, B., Kumar, G.S., Phenazinium dyes safranin O and phenosafranin induce self-structure in single stranded polyadenylic acid: Structural and thermodynamic studies, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, 132, 17-26.
- [Khan, 2014b] Khan, A.Y., Saha, B., Kumar, G.S., Interaction of phenazinium dyes with double-stranded poly(A): Spectroscopy and isothermal titration calorimetry studies, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 131, 615-624.
- [Khlebtsov, 2011] Khlebtsov, N., Dykman, L., Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies, *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(3), 1647-1671.
- [Kim, 2003] Kim, E., Kim, K., Yang, H., Kim, Y.T., Kwak, J., Enzyme-Amplified Electrochemical Detection of DNA Using Electrocatalysis of Ferrocenyl-Tethered Dendrimer, *Analytical Chemistry*, 2003, 75(21), 5665-5672.
- [Kim, 2004] Kim, Y.G., Oh, S.K., Crooks, R.M., Preparation and Characterization of 1–2 nm Dendrimer-Encapsulated Gold Nanoparticles Having Very Narrow Size Distributions, *Chemistry of Materials*, 2004, 16(1), 167-172.
- [Kirchherr, 1993] Kirchherr, H., Determination of hydrazine in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1993, 617(1), 157-162.
- [Kobayashi, 1996] Kobayashi, T., J-aggregates, 1996, World Scientific, Singapore.
- [Koçak, 2014] Koçak, S., Aslışen, B., Hydrazine oxidation at gold nanoparticles and poly(bromocresol purple) carbon nanotube modified glassy carbon electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 196, 610-618.
- [Koçak, 2016] Koçak, Ç.C., Altın, A., Aslısen, B., Koçak, S., Electrochemical Preparation and Characterization of Gold and Platinum Nanoparticles Modified Poly (taurine) Film Electrode and Its Application to Hydrazine Determination, *International Journal of Electrochemical Science*, 2016, 11, 233-249.
- [Komarova, 2005] Komarova, E., Aldissi, M., Bogomolova, A., Direct electrochemical sensor for fast reagent-free DNA detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21(1), 182-189.
- [Kometani, 2001] Kometani, N., Tsubonishi, M., Fujita, T., Asami, K., Yonezawa, Y., Preparation and Optical Absorption Spectra of Dye-Coated Au, Ag, and Au/Ag Colloidal Nanoparticles in Aqueous Solutions and in Alternate Assemblies, *Langmuir*, 2001, 17(3), 578-580.
- [Kruse, 1987] Kruse, J.A., Zaidi, S.A.J., Carlson, R.W., Significance of blood lactate levels in critically ill patients with liver disease, *The American Journal of Medicine*, 1987, 83(1), 77-82.

- [Kuila, 2012] Kuila, T., Bose, S., Mishra, A.K., Khanra, P., Kim, N.H., Lee, J.H., Chemical functionalization of graphene and its applications, *Progress in Materials Science*, 2012, 57(7), 1061-1105.
- [Kulys, 1993] Kulys, J., Wang, L., Maksimoviene, A., L-Lactate oxidase electrode based on methylene green and carbon paste, *Analytica Chimica Acta*, 1993, 274(1), 53-58.
- [Kumar, 2000] Kumar, C.V., Punzalan, E.H.A., Tan, W.B., Adenine-Thymine Base Pair Recognition by an Anthryl Probe from the DNA Minor Groove, *Tetrahedron*, 2000, 56(36), 7027-7040.
- [Kutner, 1998] Kutner, W., Wang, J., L'her, M., Buck, R.P., Analytical aspects of chemically modified electrodes: Classification, critical evaluation and recommendations (IUPAC Recommendations 1998), *Pure and Applied Chemistry*, 1998, 70(6), 1301-1318.
- [Laforgue, 2005] Laforgue, A., Addou, T., Bélanger, D., Characterization of the Deposition of Organic Molecules at the Surface of Gold by the Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Cations, *Langmuir*, 2005, 21(15), 6855-6865.
- [Lai, 2012] Lai, C.W., Hsiao, Y.H., Peng, Y.K., Chou, P.T., Facile synthesis of highly emissive carbon dots from pyrolysis of glycerol; gram scale production of carbon dots/mSiO<sub>2</sub> for cell imaging and drug release, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22(29), 14403-14409.
- [Lamas-Ardisana, 2014] Lamas-Ardisana, P.J., Loaiza, O.A., Añorga, L., Jubete, E., Borghei, M., Ruiz, V., Ochoteco, E., Cabañero, G., Grande, H.J., Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum nanoparticle-decorated carbon nanofiber and poly(diallyldimethylammonium chloride) films, *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 56, 345-351.
- [Lane, 1973a] Lane, R.F., Hubbard, A.T., Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents, *The Journal of Physical Chemistry*, 1973, 77(11), 1401-1410.
- [Lane, 1973b] Lane, R.F., Hubbard, A.T., Electrochemistry of chemisorbed molecules. II. Influence of charged chemisorbed molecules on the electrode reactions of platinum complexes, *The Journal of Physical Chemistry*, 1973, 77(11), 1411-1421.
- [Laviron, 1979] Laviron, E., General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1979, 101(1), 19-28.
- [Lawal, 2016] Lawal, A.T., Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors, *Materials Research Bulletin*, 2016, 73, 308-350.
- [Lee, 2007] Lee, K.Y., Hwang, J., Lee, Y.W., Kim, J., Han, S.W., One-step synthesis of gold nanoparticles using azacryptand and their applications in SERS and catalysis, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 316(2), 476-481.
- [Lee, 2008] Lee, C., Wei, X., Kysar, J.W., Hone, J., Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene, *Science*, 2008, 321(5887), 385-388.
- [Lei, 2012] Lei, Z., Lu, L., Zhao, X.S., The electrocapacitive properties of graphene oxide reduced by urea, *Energy and Environmental Science*, 2012, 5(4), 6391-6399.
- [Leiros, 2006] Leiros, I., Wang, E., Rasmussen, T., Oksanen, E., Repo, H., Petersen, S.B., Heikinheimo, P., Hough, E., The 2.1 Å structure of *Aerococcus viridans* l-lactate oxidase (LOX), *Acta Crystallographica Section F*, 2006, 62(12), 1185-1190.

- [Leon y Leon, 1992] Leon y Leon, C.A., Solar, J.M., Calemma, V., Radovic, L.R., Evidence for the protonation of basal plane sites on carbon, *Carbon*, 1992, 30(5), 797-811.
- [Lewis, 1959] Lewis, E.S., Johnson, M.D., The Substituent Constants of the Diazonium Ion Group, *Journal of the American Chemical Society*, 1959, 81(9), 2070-2072.
- [Leyden, 2010] Leyden, M.R., Schuman, C., Sharf, T., Kevek, J., Remcho, V.T., Minot, E.D., Fabrication and characterization of carbon nanotube field-effect transistor biosensors, 2010, Proc. SPIE 7779, Organic Semiconductors in Sensors and Bioelectronics III, 77790H.
- [Lezna, 1991] Lezna, R.O., De Tacconi, N.R., Centeno, S.A., Arvia, A.J., Adsorption of phenol on gold as studied by capacitance and reflectance measurements, *Langmuir*, 1991, 7(6), 1241-1246.
- [Li, 2002] Li, J., Cassell, A., Delzeit, L., Han, J., Meyyappan, M., Novel Three-Dimensional Electrodes: Electrochemical Properties of Carbon Nanotube Ensembles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(36), 9299-9305.
- [Li, 2003] Li, X., Zhang, S., Sun, C., Fabrication of a covalently attached multilayer film electrode containing cobalt phthalocyanine and its electrocatalytic oxidation of hydrazine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2003, 553, 139-145.
- [Li, 2004] Li, S., He, L., Xiong, F., Li, Y., Yang, G., Enhanced Fluorescent Emission of Organic Nanoparticles of an Intramolecular Proton Transfer Compound and Spontaneous Formation of One-Dimensional Nanostructures, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108(30), 10887-10892.
- [Li, 2010] Li, Q., Ohulchanskyy, T.Y., Liu, R., Koynov, K., Wu, D., Best, A., Kumar, R., Bonoiu, A., Prasad, P.N., Photoluminescent Carbon Dots as Biocompatible Nanoprobes for Targeting Cancer Cells in Vitro, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010, 114(28), 12062-12068.
- [Li, 2011a] Li, H., He, X., Liu, Y., Huang, H., Lian, S., Lee, S.T., Kang, Z., One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties, *Carbon*, 2011, 49(2), 605-609.
- [Li, 2011b] Li, X., Wang, H., Shimizu, Y., Pyatenko, A., Kawaguchi, K., Koshizaki, N., Preparation of carbon quantum dots with tunable photoluminescence by rapid laser passivation in ordinary organic solvents, *Chemical Communications*, 2011, 47(3), 932-934.
- [Li, 2011c] Li, X., Qin, Y., Picraux, S.T., Guo, Z.X., Noncovalent assembly of carbon nanotube-inorganic hybrids, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(21), 7527-7547.
- [Li, 2011d] Li, H., Ming, H., Liu, Y., Yu, H., He, X., Huang, H., Pan, K., Kang, Z., Lee, S.T., Fluorescent carbon nanoparticles: electrochemical synthesis and their pH sensitive photoluminescence properties, *New Journal of Chemistry*, 2011, 35(11), 2666-2670.
- [Li, 2012] Li, H., Kang, Z., Liu, Y., Lee, S.T., Carbon nanodots: synthesis, properties and applications, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22(46), 24230-24253.
- [Li, 2013] Li, C.X., Yu, C., Wang, C.F., Chen, S., Facile plasma-induced fabrication of fluorescent carbon dots toward high-performance white LEDs, *Journal of Materials Science*, 2013, 48(18), 6307-6311.
- [Li, 2014] Li, R., Wu, K., Liu, C., Huang, Y., Wang, Y., Fang, H., Zhang, H., Li, C., 4-Amino-1-(3-mercapto-propyl)-pyridine Hexafluorophosphate Ionic Liquid Functionalized Gold Nanoparticles for IgG Immunosensing Enhancement, *Analytical Chemistry*, 2014, 86(11), 5300-5307.

- [Li, 2015a] Li, Q., Imbrogno, J., Belfort, G., Wang, X.L., Making polymeric membranes antifouling via "grafting from" polymerization of zwitterions, *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132(21), Article ID 41781.
- [Li, 2015b] Li, S., Wang, L., Chusuei, C.C., Suarez, V.M., Blackwelder, P.L., Micic, M., Orbulescu, J., Leblanc, R.M., Nontoxic Carbon Dots Potently Inhibit Human Insulin Fibrillation, *Chemistry of Materials*, 2015, 27(5), 1764-1771.
- [Lian, 2009] Lian, W., Wang, L., Song, Y., Yuan, H., Zhao, S., Li, P., Chen, L., A hydrogen peroxide sensor based on electrochemically roughened silver electrodes, *Electrochimica Acta*, 2009, 54(18), 4334-4339.
- [Liao, 2015] Liao, H., Jiang, C., Liu, W., Vera, J.M., Seni, O.D., Demera, K., Yu, C., Tan, M., Fluorescent Nanoparticles from Several Commercial Beverages: Their Properties and Potential Application for Bioimaging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(38), 8527-8533.
- [Lin, 2009] Lin, W.J., Liao, C.S., Jhang, J.H., Tsai, Y.C., Graphene modified basal and edge plane pyrolytic graphite electrodes for electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide and  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide, *Electrochemistry Communications*, 2009, 11(11), 2153-2156.
- [Lin, 2012] Lin, K.C., Yin, C.Y., Chen, S.M., Electrocatalytic oxidation of NADH based on poly(luminol) and functionalized multi-walled carbon nanotubes, *Analyst*, 2012, 137(6), 1378-1383.
- [Lin, 2013] Lin, K.C., Li, Y.S., Chen, S.M., Electrochemical determination of nicotinamide adenine dinucleotide and hydrogen peroxide based on poly(xanthurenic acid), flavin adenine dinucleotide and functionalized multi-walled carbon nanotubes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 184, 212-219.
- [Liu, 1996] Liu, S., Ye, J., He, P., Fang, Y., Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode, *Analytica Chimica Acta*, 1996, 335(3), 239-243.
- [Liu, 1997] Liu, H., Zhanen, Z., Xiaolin, Z., Deyao, Q., Liu, Y., Yu, T., Deng, J., A phenazine methosulphate-mediated sensor sensitive to lactate based on entrapment of lactate oxidase and horseradish peroxidase in composite membrane of poly(vinyl alcohol) and regenerated silk fibroin, *Electrochimica Acta*, 1997, 42(3), 349-355.
- [Liu, 2000] Liu, Z., Shen, Z., Zhu, T., Hou, S., Ying, L., Shi, Z., Gu, Z., Organizing Single-Walled Carbon Nanotubes on Gold Using a Wet Chemical Self-Assembling Technique, *Langmuir*, 2000, 16(8), 3569-3573.
- [Liu, 2004] Liu, A., Anzai, J., Use of Polymeric Indicator for Electrochemical DNA Sensors: Poly(4-vinylpyridine) Derivative Bearing [Os(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)2Cl]<sup>2+</sup>, *Analytical Chemistry*, 2004, 76(10), 2975-2980.
- [Liu, 2006] Liu, G., Gooding, J.J., An Interface Comprising Molecular Wires and Poly(ethylene glycol) Spacer Units Self-Assembled on Carbon Electrodes for Studies of Protein Electrochemistry, *Langmuir*, 2006, 22(17), 7421-7430.
- [Liu, 2007] Liu, H., Ye, T., Mao, C., Fluorescent Carbon Nanoparticles Derived from Candle Soot, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(34), 6473-6475.
- [Liu, 2009a] Liu, R., Wu, D., Liu, S., Koynov, K., Knoll, W., Li, Q., An Aqueous Route to Multicolor Photoluminescent Carbon Dots Using Silica Spheres as Carriers, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(25), 4598-4601.

- [Liu, 2009b] Liu, Y., Chu, Z., Jin, W., A sensitivity-controlled hydrogen peroxide sensor based on self-assembled Prussian Blue modified electrode, *Electrochemistry Communications*, 2009, 11(2), 484-487.
- [Liu, 2009c] Liu, H., Ryu, S., Chen, Z., Steigerwald, M.L., Nuckolls, C., Brus, L.E., Photochemical Reactivity of Graphene, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(47), 17099-17101.
- [Liu, 2011a] Liu, L.Q., Li, Y.F., Zhan, L., Liu, Y., Huang, C.Z., One-step synthesis of fluorescent hydroxyls-coated carbon dots with hydrothermal reaction and its application to optical sensing of metal ions, *Science China Chemistry*, 2011, 54(8), 1342.
- [Liu, 2011b] Liu, C., Zhang, P., Tian, F., Li, W., Li, F., Liu, W., One-step synthesis of surface passivated carbon nanodots by microwave assisted pyrolysis for enhanced multicolor photoluminescence and bioimaging, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(35), 13163-13167.
- [Liu, 2012] Liu, S., Tian, J., Wang, L., Zhang, Y., Qin, X., Luo, Y., Asiri, A.M., Al-Youbi, A.O., Sun, X., Hydrothermal Treatment of Grass: A Low-Cost, Green Route to Nitrogen-Doped, Carbon-Rich, Photoluminescent Polymer Nanodots as an Effective Fluorescent Sensing Platform for Label-Free Detection of Cu(II) Ions, *Advanced Materials*, 2012, 24(15), 2037-2041.
- [Liu, 2016] Liu, Y., Qiu, Z., Wan, Q., Wang, Z., Wu, K., Yang, N., High-Performance Hydrazine Sensor Based on Graphene Nano Platelets Supported Metal Nanoparticles, *Electroanalysis*, 2016, 28(1), 126-132.
- [Loaiza, 2015] Loaiza, O.A., Lamas-Ardisana, P.J., Añorga, L., Jubete, E., Ruiz, V., Borghei, M., Cabañero, G., Grande, H.J., Graphitized carbon nanofiber-Pt nanoparticle hybrids as sensitive tool for preparation of screen printing biosensors. Detection of lactate in wines and ciders, *Bioelectrochemistry*, 2015, 101, 58-65.
- [Loh, 2010] Loh, K.P., Bao, Q., Ang, P.K., Yang, J., The chemistry of graphene, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20(12), 2277-2289.
- [Lomeda, 2008] Lomeda, J.R., Doyle, C.D., Kosynkin, D.V., Hwang, W.F., Tour, J.M., Diazonium Functionalization of Surfactant-Wrapped Chemically Converted Graphene Sheets, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(48), 16201-16206.
- [López, 2015] López, C., Zougagh, M., Algarra, M., Rodríguez-Castellón, E., Campos, B.B., Esteves da Silva, J.C.G., Jiménez-Jiménez, J., Ríos, A., Microwave-assisted synthesis of carbon dots and its potential as analysis of four heterocyclic aromatic amines, *Talanta*, 2015, 132, 845-850.
- [Lorenzo, 1998] Lorenzo, E., Pariente, F., Hernández, L., Tobalina, F., Darder, M., Wu, Q., Maskus, M., Abruña, H.D., Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, 13(3), 319-332.
- [Love, 2005] Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 2005, 105(4), 1103-1170.
- [Lucarelli, 2002] Lucarelli, F., Marrazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascini, M., Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 469(1), 93-99.

- [Lud, 2006] Lud, S.Q., Steenackers, M., Jordan, R., Bruno, P., Gruen, D.M., Feulner, P., Garrido, J.A., Stutzmann, M., Chemical Grafting of Biphenyl Self-Assembled Monolayers on Ultrananocrystalline Diamond, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(51), 16884-16891.
- [Luo, 2009] Luo, Z., Lu, Y., Somers, L.A., Johnson, A.T.C., High Yield Preparation of Macroscopic Graphene Oxide Membranes, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(3), 898-899.
- [Luong, 2004] Luong, J.H.T., Hrapovic, S., Wang, D., Bensebaa, F., Simard, B., Solubilization of Multiwall Carbon Nanotubes by 3-Aminopropyltriethoxysilane Towards the Fabrication of Electrochemical Biosensors with Promoted Electron Transfer, *Electroanalysis*, 2004, 16(1-2), 132-139.
- [Lynam, 2007] Lynam, C., Wallace, G.G., Officer, D.L., Electrodeposition and Characterisation of Polypyrroles Containing Sulfonated Carbon Nanotubes, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2007, 7(10), 3487-3494.
- [Ma, 2005] Ma, Y., Li, N., Yang, C., Yang, X., One-step synthesis of water-soluble gold nanoparticles/polyaniline composite and its application in glucose sensing, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005, 269(1), 1-6.
- [Ma, 2012] Ma, Z., Ming, H., Huang, H., Liu, Y., Kang, Z., One-step ultrasonic synthesis of fluorescent N-doped carbon dots from glucose and their visible-light sensitive photocatalytic ability, *New Journal of Chemistry*, 2012, 36(4), 861-864.
- [Macdonald, 2005] Macdonald, J.R., Johnson, W.B., Fundamentals of Impedance Spectroscopy, 2005, en Barsoukov, E., Macdonald, J.R. (ed.), Theory, experiment and applications, 2ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 1-26.
- [Madrid, 1999] Madrid, J., Martínez-Teruel, A., Hernández, F., Megías, M.D., A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(12), 1722-1726.
- [Maeda, 1994] Maeda, H., Yamauchi, Y., Hosoe, M., Li, T.X., Yamaguchi, E., Kasamatsu, M., Ohmori, H., Direct Covalent Modification of Glassy Carbon Surfaces with 1-Alkanols by Electrochemical Oxidation, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1994, 42(9), 1870-1873.
- [Makovos, 1985] Makovos, E.B., Liu, C.C., Measurements of lactate concentration using lactate oxidase and an electrochemical oxygen sensor, *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(2), 167-170.
- [Maldonado, 2006] Maldonado, S., Smith, T.J., Williams, R.D., Morin, S., Barton, E., Stevenson, K.J., Surface Modification of Indium Tin Oxide via Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Cations, *Langmuir*, 2006, 22(6), 2884-2891.
- [Maleki, 2012] Maleki, A., Nematollahi, D., Clausmeyer, J., Henig, J., Plumeré, N., Schuhmann, W., Electrodeposition of Catechol on Glassy Carbon Electrode and Its Electrocatalytic Activity Toward NADH Oxidation, *Electroanalysis*, 2012, 24(10), 1932-1936.
- [Malig, 2011] Malig, J., Englert, J.M., Hirsch, A., Guldi, D.M., Wet Chemistry of Graphene, *The Electrochemical Society Interface*, 2011, 20(1), 53-56.
- [Malinauskas, 1999] Malinauskas, A., Electrocatalysis at conducting polymers, *Synthetic Metals*, 1999, 107(2), 75-83.

- [Mallick, 2001] Mallick, K., Wang, Z.L., Pal, T., Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: a photochemical approach for size-controlled synthesis, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2001, 140(1), 75-80.
- [Manohar, 2008] Manohar, S., Mantz, A.R., Bancroft, K.E., Hui, C.Y., Jagota, A., Vezenov, D.V., Peeling Single-Stranded DNA from Graphite Surface to Determine Oligonucleotide Binding Energy by Force Spectroscopy, *Nano Letters*, 2008, 8(12), 4365-4372.
- [Marmur, 1961] Marmur, J., A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms, *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3(2), 208-218.
- [Marrazza, 1999] Marrazza, G., Chianella, I., Mascini, M., Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, 14(1), 43-51.
- [Marzouk, 1997] Marzouk, S.A.M., Cosofret, V.V., Buck, R.P., Yang, H., Cascio, W.E., Hassan, S.S.M., A Conducting Salt-Based Amperometric Biosensor for Measurement of Extracellular Lactate Accumulation in Ischemic Myocardium, *Analytical Chemistry*, 1997, 69(14), 2646-2652.
- [Mattevi, 2011] Mattevi, C., Kim, H., Chhowalla, M., A review of chemical vapour deposition of graphene on copper, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(10), 3324-3334.
- [McAllister, 2007] McAllister, M.J., Li, J.L., Adamson, D.H., Schniepp, H.C., Abdala, A.A., Liu, J., Herrera-Alonso, M., Milius, D.L., Car, R., Prud'homme, R.K., Aksay, I.A., Single Sheet Functionalized Graphene by Oxidation and Thermal Expansion of Graphite, *Chemistry of Materials*, 2007, 19(18), 4396-4404.
- [McCarthy, 2005] McCarthy, V.A., Harris, A., The CFTR gene and regulation of its expression, *Pediatric Pulmonology*, 2005, 40(1), 1-8.
- [McKee, 1969] McKee, D.W., Catalytic decomposition of hydrogen peroxide by metals and alloys of the platinum group, *Journal of Catalysis*, 1969, 14(4), 355-364.
- [Mégraud, 2004] Mégraud, F., *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing, *Gut*, 2004, 53(9), 1374-1384.
- [Mello, 2002] Mello, L.D., Kubota, L.T., Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chemistry*, 2002, 77(2), 237-256.
- [Merköçi, 2005] Merköçi, A., Aldavert, M., Marín, S., Alegret, S., New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling, *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24(4), 341-349.
- [Merkulova, 1973] Merkulova, N.D., Zhutaeva, G.V., Shumilova, N.A., Bagotzky, V.S., Reactions of hydrogen peroxide on a silver electrode in alkaline solution, *Electrochimica Acta*, 1973, 18(2), 169-174.
- [Merson, 2004] Merson, A., Dittrich, T., Zidon, Y., Rappich, J., Shapira, Y., Charge transfer from TiO<sub>2</sub> into adsorbed benzene diazonium compounds, *Applied Physics Letters*, 2004, 85(6), 1075-1076.
- [Metikoš-Huković, 2003] Metikoš-Huković, M., Tkalčec, E., Kwokal, A., Piljac, J., An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite coatings, *Surface and Coatings Technology*, 2003, 165(1), 40-50.
- [Miah, 2006] Miah, M.R., Ohsaka, T., Cathodic Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Using Iodide-Modified Gold Electrode in Alkaline Media, *Analytical Chemistry*, 2006, 78(4), 1200-1205.
- [Millan, 1993] Millan, K.M., Mikkelsen, S.R., Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators, *Analytical Chemistry*, 1993, 65(17), 2317-2323.

- [Millan, 1994] Millan, K.M., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R., Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode, *Analytical Chemistry*, 1994, 66(18), 2943-2948.
- [Milosavljevic, 2015] Milosavljevic, V., Nguyen, H.V., Michalek, P., Moulick, A., Kopel, P., Kizek, R., Adam, V., Synthesis of carbon quantum dots for DNA labeling and its electrochemical, fluorescent and electrophoretic characterization, *Chemical Papers*, 2015, 69(1), 192-201.
- [Mittal, 2013] Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C., Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnology Advances*, 2013, 31(2), 346-356.
- [Moffat, 1978] Moffat, J.B., General and theoretical aspects of the diazonium and diazo groups, 1978, en Patai, S. (ed.), *The Chemistry of Diazonium and Diazo Groups*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.
- [Moiroux, 1980] Moiroux, J., Elving, P.J., Mechanistic aspects of the electrochemical oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH), *Journal of the American Chemical Society*, 1980, 102(21), 6533-6538.
- [Moores, 2004] Moores, A., Goettmann, F., Sanchez, C., Le Floch, P., Phosphinine stabilised gold nanoparticles; synthesis and immobilisation on mesoporous materials, *Chemical Communications*, 2004, 2842-2843.
- [Moraitis, 2011] Moraitis, G., Špitalský, Z., Ravani, F., Siokou, A., Galiotis, C., Electrochemical oxidation of multi-wall carbon nanotubes, *Carbon*, 2011, 49(8), 2702-2708.
- [Moreno, 2000] Moreno, G., Pariente, F., Lorenzo, E., Electrocatalytic oxidation of ascorbate at glassy carbon electrodes modified with electrodeposited films derived from dihydroxybenzaldehyde isomers, *Analytica Chimica Acta*, 2000, 420(1), 29-37.
- [Moses, 1975] Moses, P.R., Wier, L., Murray, R.W., Chemically modified tin oxide electrode, *Analytical Chemistry*, 1975, 47(12), 1882-1886.
- [Müller, 2001] Müller, R.H., Jacobs, C., Kayser, O., Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 47(1), 3-19.
- [Muñoz, 2000] Muñoz, E., Maser, W.K., Benito, A.M., Martínez, M.T., De la Fuente, G.F., Righi, A., Sauvajol, J.L., Anglaret, E., Maniette, Y., Single-walled carbon nanotubes produced by cw CO<sub>2</sub>-laser ablation: study of parameters important for their formation, *Applied Physics A*, 2000, 70(2), 145-151.
- [Murphy, 2008] Murphy, C.J., Gole, A.M., Stone, J.W., Sisco, P.N., Alkilany, A.M., Goldsmith, E.C., Baxter, S.C., Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging, *Accounts of Chemical Research*, 2008, 41(12), 1721-1730.
- [Murray, 2008] Murray, R.W., Nanoelectrochemistry: Metal Nanoparticles, Nanoelectrodes, and Nanopores, *Chemical Reviews*, 2008, 108(7), 2688-2720.
- [Musameh, 2002] Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., Lin, Y., Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes, *Electrochemistry Communications*, 2002, 4(10), 743-746.
- [Nair, 2008] Nair, R.R., Blake, P., Grigorenko, A.N., Novoselov, K.S., Booth, T.J., Stauber, T., Peres, N.M.R., Geim, A.K., Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene, *Science*, 2008, 320(5881), 1308-1308.



- [Nakamoto, 2002] Nakamoto, M., Yamamoto, M., Fukusumi, M., Thermolysis of gold(I) thiolate complexes producing novel gold nanoparticles passivated by alkyl groups, *Chemical Communications*, 2002, 1622-1623.
- [Nakayama, 2002] Nakayama, M., Ihara, T., Nakano, K., Maeda, M., DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate, *Talanta*, 2002, 56(5), 857-866.
- [Nambiar, 2011] Nambiar, S., Yeow, J.T.W., Conductive polymer-based sensors for biomedical applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(5), 1825-1832.
- [Nassef, 2006] Nassef, H.M., Radi, A.E., O'Sullivan, C.K., Electrocatalytic oxidation of hydrazine at o-aminophenol grafted modified glassy carbon electrode: Reusable hydrazine amperometric sensor, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2006, 592(2), 139-146.
- [Ng, 2010] Ng, Y.H., Iwase, A., Kudo, A., Amal, R., Reducing Graphene Oxide on a Visible-Light BiVO<sub>4</sub> Photocatalyst for an Enhanced Photoelectrochemical Water Splitting, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010, 1(17), 2607-2612.
- [Nguyen, 2016a] Nguyen, T.D., Dang, T.T.H., Thai, H., Nguyen, L.H., Tran, D.L., Piro, B., Pham, M.C., One-step Electrosynthesis of Poly(1,5-diaminonaphthalene)/Graphene Nanocomposite as Platform for Lead Detection in Water, *Electroanalysis*, 2016, 28(8), 1907-1913.
- [Nguyen, 2016b] Nguyen, H.V., Richtera, L., Moulick, A., Xhaxhiu, K., Kudr, J., Cernei, N., Polanska, H., Heger, Z., Masarik, M., Kopel, P., Stiborova, M., Eckschlager, T., Adam, V., Kizek, R., Electrochemical sensing of etoposide using carbon quantum dot modified glassy carbon electrode, *Analyst*, 2016, 141(9), 2665-2675.
- [Nicholson, 1964] Nicholson, R.S., Shain, I., Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems, *Analytical Chemistry*, 1964, 36(4), 706-723.
- [Norman, 1993] Norman, R.O.C., Coxon, J.M., Principles of Organic Synthesis, 1993, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton.
- [Nugent, 2001] Nugent, J.M., Santhanam, K.S.V., Rubio, A., Ajayan, P.M., Fast Electron Transfer Kinetics on Multiwalled Carbon Nanotube Microbundle Electrodes, *Nano Letters*, 2001, 1(2), 87-91.
- [Occhialini, 1997] Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., Bébéar, C.M., Lamouliatte, H., Mégraud, F., Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41(12), 2724-2728.
- [O'Connell, 2001] O'Connell, M.J., Boul, P., Ericson, L.M., Huffman, C., Wang, Y., Haroz, E., Kuper, C., Tour, J., Ausman, K.D., Smalley, R.E., Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping, *Chemical Physics Letters*, 2001, 342(3), 265-271.
- [Ojani, 2010] Ojani, R., Raoof, J.B., Babazadeh, R., Electrocatalytic Oxidation of Hydrogen Peroxide on Poly(*m*-toluidine)-Nickel Modified Carbon Paste Electrode in Alkaline Medium, *Electroanalysis*, 2010, 22(14), 1607-1616.
- [Oliveira, 2015] Oliveira, N., Souza, E., Ferreira, D., Zanforlin, D., Bezerra, W., Borba, A.M., Arruda, M., Lopes, K., Nascimento, G., Martins, D., Cordeiro, M., Lima-Filho, J., A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences, *Sensors*, 2015, 15(7), 15562-15577.
- [Ozkan-Ariksoysal, 2017] Ozkan-Ariksoysal, D., Kayran, Y.U., Yilmaz, F.F., Ciucu, A.A., David, I.G., David, V., Hosgor-Limoncu, M., Ozsoz, M., DNA-wrapped multi-walled carbon nanotube

- modified electrochemical biosensor for the detection of *Escherichia coli* from real samples, *Talanta*, 2017, 166, 27-35.
- [Ozoemena, 2006] Ozoemena, K.I., Anodic Oxidation and Amperometric Sensing of Hydrazine at a Glassy Carbon Electrode Modified with Cobalt (II) Phthalocyanine–cobalt (II) Tetraphenylporphyrin (CoPc-(CoTPP)(4)) Supramolecular Complex, *Sensors*, 2006, 6(8), 874-891.
- [Palacký, 2011] Palacký, J., Mojzeš, P., Bok, J., SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011, 42(7), 1528-1539.
- [Palanisamy, 2012] Palanisamy, S., Chen, S.M., Sarawathi, R., A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on reduced graphene oxide/ZnO composite modified electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 166, 372-377.
- [Pamidi, 1996] Pamidi, P.V.A., Wang, J., Electrocatalysis and measurements of hydrazine compounds at glassy carbon electrodes coated with electropolymerized 3,4-dihydroxybenzaldehyde films, *Electroanalysis*, 1996, 8(3), 244-247.
- [Pang, 1995] Pang, D.W., Qi, Y.P., Wang, Z.L., Cheng, J.K., Wang, J.W., Electrochemical oxidation of DNA at a gold microelectrode, *Electroanalysis*, 1995, 7(8), 774-777.
- [Pang, 2000] Pang, D.W., Abruña, H.D., Interactions of Benzyl Viologen with Surface-Bound Single- and Double-Stranded DNA, *Analytical Chemistry*, 2000, 72(19), 4700-4706.
- [Pariente, 1994] Pariente, F., Lorenzo, E., Abruña, H.D., Electrocatalysis of NADH Oxidation with Electropolymerized Films of 3,4-Dihydroxybenzaldehyde, *Analytical Chemistry*, 1994, 66(23), 4337-4344.
- [Pariente, 1996] Pariente, F., Tobalina, F., Darder, M., Lorenzo, E., Abruña, H.D., Electrodeposition of Redox-Active Films of Dihydroxybenzaldehydes and Related Analogs and Their Electrocatalytic Activity toward NADH Oxidation, *Analytical Chemistry*, 1996, 68(18), 3135-3142.
- [Park, 1997] Park, T.M., Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., Freaney, R., McShane, A.J., Sol-gel based amperometric biosensor incorporating an osmium redox polymer as mediator for detection of l-lactate, *Talanta*, 1997, 44(6), 973-978.
- [Park, 2009] Park, S., Ruoff, R.S., Chemical methods for the production of graphenes, *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(4), 217-224.
- [Parra, 2006a] Parra, A., Casero, E., Vázquez, L., Pariente, F., Lorenzo, E., Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 555(2), 308-315.
- [Parra, 2006b] Parra, A., Casero, E., Vázquez, L., Jin, J., Pariente, F., Lorenzo, E., Microscopic and Voltammetric Characterization of Bioanalytical Platforms Based on Lactate Oxidase, *Langmuir*, 2006, 22(12), 5443-5450.
- [Pastor, 1983] Pastor, T.J., Vajgand, V.J., Antonijević, V.V., Coulometric determination of thiols and hydrazines with electrogenerated iodine in methanol in the presence of potassium acetate, *Microchimica Acta*, 1983, 81(3), 203-211.
- [Pei, 2010] Pei, S., Zhao, J., Du, J., Ren, W., Cheng, H.M., Direct reduction of graphene oxide films into highly conductive and flexible graphene films by hydrohalic acids, *Carbon*, 2010, 48(15), 4466-4474.

- [Pei, 2012] Pei, S., Cheng, H.M., The reduction of graphene oxide, *Carbon*, 2012, 50(9), 3210-3228.
- [Peng, 2006] Peng, H., Soeller, C., Cannell, M.B., Bowmaker, G.A., Cooney, R.P., Travas-Sejdic, J., Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(9), 1727-1736.
- [Peng, 2009] Peng, H., Travas-Sejdic, J., Simple Aqueous Solution Route to Luminescent Carbogenic Dots from Carbohydrates, *Chemistry of Materials*, 2009, 21(23), 5563-5565.
- [Pereira, 2011] Pereira, A.C., Kisner, A., Tarley, C.R.T., Kubota, L.T., Development of a Carbon Paste Electrode for Lactate Detection Based on Meldola's Blue Adsorbed on Silica Gel Modified with Niobium Oxide and Lactate Oxidase, *Electroanalysis*, 2011, 23(6), 1470-1477.
- [Pérez, 2012] Pérez, S., Fàbregas, E., Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples, *Analyst*, 2012, 137(16), 3854-3861.
- [Pettibone, 2011] Pettibone, J.M., Hudgens, J.W., Gold Cluster Formation with Phosphine Ligands: Etching as a Size-Selective Synthetic Pathway for Small Clusters?, *ACS Nano*, 2011, 5(4), 2989-3002.
- [Piletsky, 2000] Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Chen, B., Karim, K., Weston, D., Barrett, G., Lowe, P., Turner, A.P.F., Chemical Grafting of Molecularly Imprinted Homopolymers to the Surface of Microplates. Application of Artificial Adrenergic Receptor in Enzyme-Linked Assay for  $\beta$ -Agonists Determination, *Analytical Chemistry*, 2000, 72(18), 4381-4385.
- [Pina, 1998] Pina, M., Occhialini, A., Monteiro, L., Doermann, H.P., Mégraud, F., Detection of Point Mutations Associated with Resistance of *Helicobacter pylori* to Clarithromycin by Hybridization in Liquid Phase, *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(11), 3285-3290.
- [Pinson, 2005] Pinson, J., Podvorica, F., Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts, *Chemical Society Reviews*, 2005, 34(5), 429-439.
- [Pokropivny, 2007] Pokropivny, V., Lohmus, R., Hussainova, I., Pokropivny, A., Vlassov, S., Introduction to nanomaterials and nanotechnology, 2007, Tartu University Press, Ukraine.
- [Ponomarenko, 2008] Ponomarenko, L.A., Schedin, F., Katsnelson, M.I., Yang, R., Hill, E.W., Novoselov, K.S., Geim, A.K., Chaotic Dirac Billiard in Graphene Quantum Dots, *Science*, 2008, 320(5874), 356-358.
- [Popovich, 2002] Popovich, N.D., Eckhardt, A.E., Mikulecky, J.C., Napier, M.E., Thomas, R.S., Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids, *Talanta*, 2002, 56(5), 821-828.
- [Poursaberi, 2012] Poursaberi, T., Hassanisadi, M., Application of metalloporphyrin grafted-graphene oxide for the construction of a novel salicylate-selective electrode, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2012, 16(10), 1140-1147.
- [Przybyt, 2014] Przybyt, M., Lactate biosensors for food industry, *Biotechnology and Food Science*, 2014, 78(1), 71-88.
- [Puchakayala, 2012] Puchakayala, S., Annamalai, S.K., Electrocatalytic Oxidation of NADH Using Alizarin Immobilized Carbon Nanotube Modified Electrode, *ECS Transactions*, 2012, 41(27), 9-14.
- [Pumera, 2008] Pumera, M., Sasaki, T., Iwai, H., Relationship between Carbon Nanotube Structure and Electrochemical Behavior: Heterogeneous Electron Transfer at

- Electrochemically Activated Carbon Nanotubes, *Chemistry - An Asian Journal*, 2008, 3(12), 2046-2055.
- [Qiaocui, 2005] Qiaocui, S., Tuzhi, P., Yunu, Z., Yang, C.F., An Electrochemical Biosensor with Cholesterol Oxidase/ Sol-Gel Film on a Nanoplatinum/Carbon Nanotube Electrode, *Electroanalysis*, 2005, 17(10), 857-861.
- [Qin, 2015] Qin, X., Wang, H., Miao, Z., Li, J., Chen, Q., A novel non-enzyme hydrogen peroxide sensor based on catalytic reduction property of silver nanowires, *Talanta*, 2015, 139, 56-61.
- [Qu, 2013] Qu, D., Zheng, M., Du, P., Zhou, Y., Zhang, L., Li, D., Tan, H., Zhao, Z., Xie, Z., Sun, Z., Highly luminescent S, N co-doped graphene quantum dots with broad visible absorption bands for visible light photocatalysts, *Nanoscale*, 2013, 5(24), 12272-12277.
- [Radovic, 1997] Radovic, L.R., Silva, I.F., Ume, J.I., Menéndez, J.A., Leon y Leon, C.A., Scaroni, A.W., An experimental and theoretical study of the adsorption of aromatics possessing electron-withdrawing and electron-donating functional groups by chemically modified activated carbons, *Carbon*, 1997, 35(9), 1339-1348.
- [Rahman, 2015] Rahman, M.M., Li, X.B., Lopa, S.N., Ahn, J.S., Lee, J.J., Electrochemical DNA Hybridization Sensors Based on Conducting Polymers, *Sensors*, 2015, 15(2), 3801-3829.
- [Raj, 2006] Raj, C.R., Chakraborty, S., Carbon nanotubes–polymer–redox mediator hybrid thin film for electrocatalytic sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22(5), 700-706.
- [Rasheed, 2014] Rasheed, P.A., Sandhyarani, N., Graphene-DNA electrochemical sensor for the sensitive detection of BRCA1 gene, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 204, 777-782.
- [Raven, 2017] Raven, P., Mason, K.A., Losos, J.B., Singer, S.R., *Biology*, 2017, Mc Graw-Hill Education, New York.
- [Ravenna, 2015] Ravenna, Y., Xia, L., Gun, J., Mikhaylov, A.A., Medvedev, A.G., Lev, O., Alfonta, L., Biocomposite Based on Reduced Graphene Oxide Film Modified with Phenothiazone and Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Glucose Dehydrogenase for Glucose Sensing and Biofuel Cell Applications, *Analytical Chemistry*, 2015, 87(19), 9567-9571.
- [Ray, 2009] Ray, S.C., Saha, A., Jana, N.R., Sarkar, R., Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(43), 18546-18551.
- [Remediakis, 2005] Remediakis, I.N., Lopez, N., Nørskov, J.K., CO oxidation on gold nanoparticles: Theoretical studies, *Applied Catalysis A: General*, 2005, 291(1), 13-20.
- [Ren, 2016] Ren, Q., Feng, L., Fan, R., Ge, X., Sun, Y., Water-dispersible triethylenetetramine-functionalized graphene: Preparation, characterization and application as an amperometric glucose sensor, *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 68, 308-316.
- [Renaudie, 2007] Renaudie, L., Le Narvor, C., Lepleux, E., Roger, P., Functionalization of Poly(ethylene terephthalate) Fibers by Photografting of a Carbohydrate Derivatized with a Phenyl Azide Group, *Biomacromolecules*, 2007, 8(2), 679-685.
- [Reuillard, 2014] Reuillard, B., Le Goff, A., Cosnier, S., Polypyrrolic Bipyridine Bis(phenantrolinequinone) Ru(II) Complex/Carbon Nanotube Composites for NAD-Dependent Enzyme Immobilization and Wiring, *Analytical Chemistry*, 2014, 86(9), 4409-4415.

- [Revenga-Parra, 2005] Revenga-Parra, M., Lorenzo, E., Pariente, F., Synthesis and electrocatalytic activity towards oxidation of hydrazine of a new family of hydroquinone salophen derivatives: application to the construction of hydrazine sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, 107(2), 678-687.
- [Revenga-Parra, 2007] Revenga-Parra, M., García, T., Lorenzo, E., Pariente, F., Comprehensive study of interactions between DNA and new electroactive Schiff base ligands: Application to the detection of singly mismatched *Helicobacter pylori* sequences, *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(11), 2675-2681.
- [Revenga-Parra, 2008] Revenga-Parra, M., García, T., Lorenzo, E., Pariente, F., Electrocatalytic oxidation of methanol and other short chain aliphatic alcohols on glassy carbon electrodes modified with conductive films derived from  $Ni^{II}$ -(*N,N'*-bis(2,5-dihydroxybenzylidene)-1,2-diaminobenzene), *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 130(2), 730-738.
- [Revenga-Parra, 2014] Revenga-Parra, M., García-Mendiola, T., González-Costas, J., González-Romero, E., Marín, A.G., Pau, J.L., Pariente, F., Lorenzo, E., Simple diazonium chemistry to develop specific gene sensing platforms, *Analytica Chimica Acta*, 2014, 813, 41-47.
- [Riordan, 1989a] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L.C., Erratum: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [Science, 245, 4922: 1066-1073 (1989)], *Science*, 1989, 245(4925), 1437-1437.
- [Riordan, 1989b] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L.C., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science*, 1989, 245(4922), 1066-1073.
- [Roduner, 2006] Roduner, E., Size matters: why nanomaterials are different, *Chemical Society Reviews*, 2006, 35(7), 583-592.
- [Saengsookwaow, 2016] Saengsookwaow, C., Rangkupan, R., Chailapakul, O., Rodthongkum, N., Nitrogen-doped graphene-polyvinylpyrrolidone/gold nanoparticles modified electrode as a novel hydrazine sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 227, 524-532.
- [Safavi, 1995] Safavi, A., Ensafi, A.A., Kinetic spectrophotometric determination of hydrazine, *Analytica Chimica Acta*, 1995, 300(1), 307-311.
- [Saha, 2010] Saha, I., Hossain, M., Kumar, G.S., Base pair specificity and energetics of binding of the phenazinium molecules phenosafranine and safranine-O to deoxyribonucleic acids: a comparative study, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, 12(39), 12771-12779.
- [Sahu, 2012] Sahu, S., Behera, B., Maiti, T.K., Mohapatra, S., Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents, *Chemical Communications*, 2012, 48(70), 8835-8837.
- [Salimi, 2011] Salimi, A., Mahdioun, M., Noorbakhsh, A., Abdolmaleki, A., Ghavami, R., A novel non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on single walled carbon nanotubes-manganese complex modified glassy carbon electrode, *Electrochimica Acta*, 2011, 56(9), 3387-3394.
- [Salinas-Torres, 2013] Salinas-Torres, D., Sieben, J.M., Lozano-Castelló, D., Cazorla-Amorós, D., Morallón, E., Asymmetric hybrid capacitors based on activated carbon and activated carbon fibre-PANI electrodes, *Electrochimica Acta*, 2013, 89, 326-333.

- [Samec, 1983] Samec, Z., Elving, P.J., Anodic oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide at solid electrodes, Mediation by surface species, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1983, 144(1), 217-234.
- [Sanchez-Tirado, 2016] Sanchez-Tirado, E., Gonzalez-Cortes, A., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J.M., Carbon nanotubes functionalized by click chemistry as scaffolds for the preparation of electrochemical immunosensors. Application to the determination of TGF-beta 1 cytokine, *Analyst*, 2016, 141(20), 5730-5737.
- [Sandler, 1999] Sandler, J., Shaffer, M.S.P., Prasse, T., Bauhofer, W., Schulte, K., Windle, A.H., Development of a dispersion process for carbon nanotubes in an epoxy matrix and the resulting electrical properties, *Polymer*, 1999, 40(21), 5967-5971.
- [Saravanan Jayanthi, 1998] Saravanan Jayanthi, S., Ramamurthy, P., Excited singlet state reaction of phenosafranine with electron donors Role of the heavy-atom effect in triplet induction, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 1998, 94(12), 1675-1679.
- [Sarkar, 2008] Sarkar, D., Das, P., Basak, S., Chattopadhyay, N., Binding Interaction of Cationic Phenazinium Dyes with Calf Thymus DNA: A Comparative Study, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(30), 9243-9249.
- [Sau, 2001] Sau, T.K., Pal, A., Jana, N.R., Wang, Z.L., Pal, T., Size Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles using Photochemically Prepared Seed Particles, *Journal of Nanoparticle Research*, 2001, 3(4), 257-261.
- [Schniepp, 2006] Schniepp, H.C., Li, J.L., McAllister, M.J., Sai, H., Herrera-Alonso, M., Adamson, D.H., Prud'homme, R.K., Car, R., Saville, D.A., Aksay, I.A., Functionalized Single Graphene Sheets Derived from Splitting Graphite Oxide, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110(17), 8535-8539.
- [Scholz, 2010] Scholz, F., Electroanalytical methods: guide to experiments and applications, 2010, 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [Shahrashoob, 2016] Shahrashoob, M., Mohsenifar, A., Tabatabaei, M., Rahmani-Cherati, T., Mobaraki, M., Mota, A., Shojaei, T.R., Detection of *Helicobacter Pylori* Genome with an Optical Biosensor Based on Hybridization of Urease Gene with a Gold Nanoparticles-Labeled Probe, *Journal of Applied Spectroscopy*, 2016, 83(2), 322-329.
- [Sham, 2006] Sham, M.L., Kim, J.K., Surface functionalities of multi-wall carbon nanotubes after UV/Ozone and TETA treatments, *Carbon*, 2006, 44(4), 768-777.
- [Shanehsaz, 2013] Shanehsaz, M., Mohsenifar, A., Hasannia, S., Pirooznia, N., Samaei, Y., Shamsipur, M., Detection of *Helicobacter pylori* with a nanobiosensor based on fluorescence resonance energy transfer using CdTe quantum dots, *Microchimica Acta*, 2013, 180(3), 195-202.
- [Shankar, 2003] Shankar, S.S., Ahmad, A., Pasricha, R., Sastry, M., Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes, *Journal of Materials Chemistry*, 2003, 13(7), 1822-1826.
- [Shen, 2014] Shen, P., Xia, Y., Synthesis-Modification Integration: One-Step Fabrication of Boronic Acid Functionalized Carbon Dots for Fluorescent Blood Sugar Sensing, *Analytical Chemistry*, 2014, 86(11), 5323-5329.
- [Shi, 2014] Shi, A., Wang, J., Han, X., Fang, X., Zhang, Y., A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 200, 206-212.

- [Shim, 2011] Shim, J.H., Kim, J., Lee, C., Lee, Y., Electrocatalytic Activity of Gold and Gold Nanoparticles Improved by Electrochemical Pretreatment, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011, 115(1), 305-309.
- [Shin, 2009] Shin, H.J., Kim, K.K., Benayad, A., Yoon, S.M., Park, H.K., Jung, I.S., Jin, M.H., Jeong, H.K., Kim, J.M., Choi, J.Y., Lee, Y.H., Efficient Reduction of Graphite Oxide by Sodium Borohydride and Its Effect on Electrical Conductance, *Advanced Functional Materials*, 2009, 19(12), 1987-1992.
- [Shin, 2017] Shin, D.G., Yeo, H., Ku, B.C., Goh, M., You, N.H., A facile synthesis method for highly water-dispersible reduced graphene oxide based on covalently linked pyridinium salt, *Carbon*, 2017, 121, 17-24.
- [Shon, 2001] Shon, Y.S., Mazzitelli, C., Murray, R.W., Unsymmetrical Disulfides and Thiol Mixtures Produce Different Mixed Monolayer-Protected Gold Clusters, *Langmuir*, 2001, 17(25), 7735-7741.
- [Sifontes, 2010] Sifontes, A.B., Melo, L., Maza, C., Mendes, J.J., Mediavilla, M., Brito, J.L., Zoltan, T., Alborno, A., Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes, *Química Nova*, 2010, 33, 1266-1269.
- [Simmons, 2009] Simmons, T.J., Bult, J., Hashim, D.P., Linhardt, R.J., Ajayan, P.M., Noncovalent Functionalization as an Alternative to Oxidative Acid Treatment of Single Wall Carbon Nanotubes with Applications for Polymer Composites, *ACS Nano*, 2009, 3(4), 865-870.
- [Sirajuddin, 2010] Sirajuddin, Mechler, A., Torriero, A.A.J., Nafady, A., Lee, C.Y., Bond, A.M., O'Mullane, A.P., Bhargava, S.K., The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of HAuCl<sub>4</sub>, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, 370(1-3), 35-41.
- [Sk, 2014] Sk, M.P., Chattopadhyay, A., Induction coil heater prepared highly fluorescent carbon dots as invisible ink and explosive sensor, *RSC Advances*, 2014, 4(60), 31994-31999.
- [Smolenkov, 2012] Smolenkov, A.D., Chromatographic methods of determining hydrazine and its polar derivatives, 2012, 2(4), 329-354.
- [Smyth, 2005] Smyth, R.L., Diagnosis and management of cystic fibrosis, *Archives of disease in childhood - Education and practice edition*, 2005, 90(1), ep1-ep6.
- [Stankovich, 2006] Stankovich, S., Dikin, D.A., Dommett, G.H.B., Kohlhaas, K.M., Zimney, E.J., Stach, E.A., Piner, R.D., Nguyen, S.B.T., Ruoff, R.S., Graphene-based composite materials, *Nature*, 2006, 442(7100), 282-286.
- [Stankovich, 2007] Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.B.T., Ruoff, R.S., Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon*, 2007, 45(7), 1558-1565.
- [Stanley, 1985] Stanley, W.C., Gertz, E.W., Wisneski, J.A., Morris, D.L., Neese, R.A., Brooks, G.A., Systemic lactate kinetics during graded exercise in man, *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 1985, 249(6), E595-E602.
- [Steel, 1998] Steel, A.B., Herne, T.M., Tarlov, M.J., Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold, *Analytical Chemistry*, 1998, 70(22), 4670-4677.
- [Stergiou, 2010] Stergiou, D.V., Diamanti, E.K., Gournis, D., Prodromidis, M.I., Comparative study of different types of graphenes as electrocatalysts for ascorbic acid, *Electrochemistry Communications*, 2010, 12(10), 1307-1309.

- [Stewart, 2004] Stewart, M.P., Maya, F., Kosynkin, D.V., Dirk, S.M., Stapleton, J.J., McGuiness, C.L., Allara, D.L., Tour, J.M., Direct Covalent Grafting of Conjugated Molecules onto Si, GaAs, and Pd Surfaces from Aryldiazonium Salts, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(1), 370-378.
- [Stoller, 2008] Stoller, M.D., Park, S., Zhu, Y., An, J., Ruoff, R.S., Graphene-Based Ultracapacitors, *Nano Letters*, 2008, 8(10), 3498-3502.
- [Strano, 2003] Strano, M.S., Dyke, C.A., Usrey, M.L., Barone, P.W., Allen, M.J., Shan, H., Kittrell, C., Hauge, R.H., Tour, J.M., Smalley, R.E., Electronic Structure Control of Single-Walled Carbon Nanotube Functionalization, *Science*, 2003, 301(5639), 1519-1522.
- [Su, 2003] Su, K.H., Wei, Q.H., Zhang, X., Mock, J.J., Smith, D.R., Schultz, S., Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles, *Nano Letters*, 2003, 3(8), 1087-1090.
- [Suman, 2005] Suman, S., Singhal, R., Sharma, A.L., Malthotra, B.D., Pundir, C.S., Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, 107(2), 768-772.
- [Sun, 2006] Sun, Y.P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K.A.S., Pathak, P., Meziani, M.J., Harruff, B.A., Wang, X., Wang, H., Luo, P.G., Yang, H., Kose, M.E., Chen, B., Veca, L.M., Xie, S.Y., Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(24), 7756-7757.
- [Sun, 2008] Sun, Y.P., Wang, X., Lu, F., Cao, L., Meziani, M.J., Luo, P.G., Gu, L., Veca, L.M., Doped Carbon Nanoparticles as a New Platform for Highly Photoluminescent Dots, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112(47), 18295-18298.
- [Sun, 2013] Sun, H., Dong, L., Yu, H., Huo, M., Direct electrochemical oxidation and detection of hydrazine on a boron doped diamond (BDD) electrode, *Russian Journal of Electrochemistry*, 2013, 49(9), 883-887.
- [Sutter, 2008] Sutter, P.W., Flege, J.I., Sutter, E.A., Epitaxial graphene on ruthenium, *Nature Materials*, 2008, 7(5), 406-411.
- [Suye, 2005] Suye, S., Matsuura, T., Kimura, T., Zheng, H., Hori, T., Amano, Y., Katayama, H., Amperometric DNA sensor using gold electrode modified with polymerized mediator by layer-by-layer adsorption, *Microelectronic Engineering*, 2005, 81(2), 441-447.
- [Takahashi, 2013] Takahashi, S., Abiko, N., Anzai, J., Redox Response of Reduced Graphene Oxide-Modified Glassy Carbon Electrodes to Hydrogen Peroxide and Hydrazine, *Materials*, 2013, 6(5), 1840-1850.
- [Tan, 2013] Tan, C., Xu, X.H., Wang, F., Li, Z.L., Liu, J.J., Ji, J., Carbon black supported ultra-high loading silver nanoparticle catalyst for electro-oxidation and determination of hydrazine, *Science China Chemistry*, 2013, 56(7), 911-916.
- [Tang, 2012] Tang, L., Ji, R., Cao, X., Lin, J., Jiang, H., Li, X., Teng, K.S., Luk, C.M., Zeng, S., Hao, J., Lau, S.P., Deep Ultraviolet Photoluminescence of Water-Soluble Self-Passivated Graphene Quantum Dots, *ACS Nano*, 2012, 6(6), 5102-5110.
- [Tao, 2012] Tao, H., Yang, K., Ma, Z., Wan, J., Zhang, Y., Kang, Z., Liu, Z., In Vivo NIR Fluorescence Imaging, Biodistribution, and Toxicology of Photoluminescent Carbon Dots Produced from Carbon Nanotubes and Graphite, *Small*, 2012, 8(2), 281-290.
- [Templeton, 2000a] Templeton, A.C., Wuelfing, W.P., Murray, R.W., Monolayer-Protected Cluster Molecules, *Accounts of Chemical Research*, 2000, 33(1), 27-36.



- [Templeton, 2000b] Templeton, A.C., Pietron, J.J., Murray, R.W., Mulvaney, P., Solvent Refractive Index and Core Charge Influences on the Surface Plasmon Absorbance of Alkanethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2000, 104(3), 564-570.
- [Thakur, 2016] Thakur, V.K., Thakur, M.K., Chemical functionalization of carbon nanomaterials: chemistry and applications, 2016, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- [Thanh, 2010] Thanh, N.T.K., Green, L.A.W., Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Nano Today*, 2010, 5(3), 213-230.
- [Thévenot, 2001] Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16(1), 121-131.
- [Thiberge, 2004] Thiberge, S., Nechushtan, A., Sprinzak, D., Gileadi, O., Behar, V., Zik, O., Chowes, Y., Michaeli, S., Schlessinger, J., Moses, E., Scanning electron microscopy of cells and tissues under fully hydrated conditions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(10), 3346-3351.
- [Thompson, 2003] Thompson, L.A., Kowalik, J., Josowicz, M., Janata, J., Label-Free DNA Hybridization Probe Based on a Conducting Polymer, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(2), 324-325.
- [Tian, 2009] Tian, L., Ghosh, D., Chen, W., Pradhan, S., Chang, X., Chen, S., Nanosized Carbon Particles From Natural Gas Soot, *Chemistry of Materials*, 2009, 21(13), 2803-2809.
- [Ting, 2009] Ting, B.P., Zhang, J., Gao, Z., Ying, J.Y., A DNA biosensor based on the detection of doxorubicin-conjugated Ag nanoparticle labels using solid-state voltammetry, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25(2), 282-287.
- [Toikkanen, 2008] Toikkanen, O., Ruiz, V., Rönholm, G., Kalkkinen, N., Liljeroth, P., Quinn, B.M., Synthesis and Stability of Monolayer-Protected Au<sub>38</sub> Clusters, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(33), 11049-11055.
- [Tong, 2015] Tong, G., Wang, J., Wang, R., Guo, X., He, L., Qiu, F., Wang, G., Zhu, B., Zhu, X., Liu, T., Amorphous carbon dots with high two-photon fluorescence for cellular imaging passivated by hyperbranched poly(amino amine), *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(4), 700-706.
- [Touhara, 2002] Touhara, H., Inahara, J., Mizuno, T., Yokoyama, Y., Okanao, S., Yanagiuchi, K., Mukopadhyay, I., Kawasaki, S., Okino, F., Shirai, H., Xu, W.H., Kyotani, T., Tomita, A., Property control of new forms of carbon materials by fluorination, *Journal of Fluorine Chemistry*, 2002, 114(2), 181-188.
- [Tsang, 1997] Tsang, S.C., Guo, Z., Chen, Y.K., Green, M.L.H., Hill, H.A.O., Hambley, T.W., Sadler, P.J., Immobilization of Platinated and Iodinated Oligonucleotides on Carbon Nanotubes, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1997, 36(20), 2198-2200.
- [Tse, 1978] Tse, D.C.S., Kuwana, T., Electrocatalysis of dihydronicotinamide adenosine diphosphate with quinones and modified quinone electrodes, *Analytical Chemistry*, 1978, 50(9), 1315-1318.
- [Tsui, 1992] Tsui, L.C., The spectrum of cystic fibrosis mutations, *Trends in Genetics*, 1992, 8(11), 392-398.
- [Tuinstra, 1970] Tuinstra, F., Koenig, J.L., Raman Spectrum of Graphite, *The Journal of Chemical Physics*, 1970, 53(3), 1126-1130.

- [Turkevich, 1951] Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 1951, 11, 55-75.
- [Turkevich, 1985] Turkevich, J., Colloidal gold. Part I, *Gold Bulletin*, 1985, 18(3), 86-91.
- [Uemura, 2001] Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., Schlemper, R.J., *Helicobacter pylori* Infection and the Development of Gastric Cancer, *New England Journal of Medicine*, 2001, 345(11), 784-789.
- [Ulman, 1996] Ulman, A., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chemical Reviews*, 1996, 96(4), 1533-1554.
- [Umena, 2006] Umena, Y., Yorita, K., Matsuoka, T., Kita, A., Fukui, K., Morimoto, Y., The crystal structure of l-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 350(2), 249-256.
- [van Doorn, 1999] van Doorn, L.J., Debets-Ossenkopp, Y.J., Marais, A., Sanna, R., Mégraud, F., Kusters, J.G., Quint, W.G.V., Rapid Detection, by PCR and Reverse Hybridization, of Mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA Gene, Associated with Macrolide Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(7), 1779-1782.
- [Vander Wal, 2001] Vander Wal, R.L., Tich, T.M., Flame and Furnace Synthesis of Single-Walled and Multi-Walled Carbon Nanotubes and Nanofibers, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105(42), 10249-10256.
- [Vanýsek, 2009] Vanýsek, P., Electrochemical series, *Crystallography Reviews*, 2009, en Lide, D.R. (ed.) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition (Internet Version 2009), CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 15(3), 223-224.
- [Vennerstrom, 1995] Vennerstrom, J.L., Makler, M.T., Angerhofer, C.K., Williams, J.A., Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39(12), 2671-2677.
- [Vernot, 1985] Vernot, E.H., MacEwen, J.D., Bruner, R.H., Haun, C.C., Kinkead, E.R., Prentice, D.E., Hall, A., Schmidt, R.E., Eason, R.L., Hubbard, G.B., Young, J.T., Long-term inhalation toxicity of hydrazine, *Fundamental and Applied Toxicology*, 1985, 5(6), 1050-1064.
- [Vidal, 2003] Vidal, J.C., Garcia-Ruiz, E., Espuelas, J., Aramendia, T., Castillo, J.R., Comparison of biosensors based on entrapment of cholesterol oxidase and cholesterol esterase in electropolymerized films of polypyrrole and diamionaphthalene derivatives for amperometric determination of cholesterol, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377(2), 273-280.
- [Villmow, 2008] Villmow, T., Pötschke, P., Pegel, S., Häussler, L., Kretzschmar, B., Influence of twin-screw extrusion conditions on the dispersion of multi-walled carbon nanotubes in a poly(lactic acid) matrix, *Polymer*, 2008, 49(16), 3500-3509.
- [Voccia, 2006] Voccia, S., Gabriel, S., Serwas, H., Jérôme, R., Jérôme, C., Electrografting of thin polymer films: Three strategies for the tailoring of functional adherent coatings, *Progress in Organic Coatings*, 2006, 55(2), 175-181.
- [Vollhardt, 1999] Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E., Organic chemistry: structure and function, 1999, 3rd ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- [Wang, 1996a] Wang, J., Chen, Q., Cepria, G., Electrocatalytic modified electrode for remote monitoring of hydrazines, *Talanta*, 1996, 43(8), 1387-1391.

- [Wang, 1996b] Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N., DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus, *Analytical Chemistry*, 1996, 68(15), 2629-2634.
- [Wang, 1998] Wang, J., Fernandes, J.R., Kubota, L.T., Polishable and Renewable DNA Hybridization Biosensors, *Analytical Chemistry*, 1998, 70(17), 3699-3702.
- [Wang, 2004a] Wang, L., Wang, E., Direct electron transfer between cytochrome c and a gold nanoparticles modified electrode, *Electrochemistry Communications*, 2004, 6(1), 49-54.
- [Wang, 2004b] Wang, J., Analytical Electrochemistry, 2004, 2nd ed. Wiley-VCH, New York.
- [Wang, 2005] Wang, J., Nanomaterial-based electrochemical biosensors, *Analyst*, 2005, 130(4), 421-426.
- [Wang, 2008a] Wang, G., Yang, J., Park, J., Gou, X., Wang, B., Liu, H., Yao, J., Facile Synthesis and Characterization of Graphene Nanosheets, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112(22), 8192-8195.
- [Wang, 2008b] Wang, X., Zhi, L., Müllen, K., Transparent, Conductive Graphene Electrodes for Dye-Sensitized Solar Cells, *Nano Letters*, 2008, 8(1), 323-327.
- [Wang, 2009a] Wang, H., Robinson, J.T., Li, X., Dai, H., Solvothermal Reduction of Chemically Exfoliated Graphene Sheets, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(29), 9910-9911.
- [Wang, 2009b] Wang, X., Cao, L., Lu, F., Meziani, M.J., Li, H., Qi, G., Zhou, B., Harruff, B.A., Kermarrec, F., Sun, Y.P., Photoinduced electron transfers with carbon dots, *Chemical Communications*, 2009, 3774-3776.
- [Wang, 2010] Wang, C., Zhang, L., Guo, Z., Xu, J., Wang, H., Zhai, K., Zhuo, X., A novel hydrazine electrochemical sensor based on the high specific surface area graphene, *Microchimica Acta*, 2010, 169(1), 1-6.
- [Wang, 2011a] Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J., Lin, Y., Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(5), 205-212.
- [Wang, 2011b] Wang, X., Qu, K., Xu, B., Ren, J., Qu, X., Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(8), 2445-2450.
- [Wang, 2012] Wang, J., Wang, C.F., Chen, S., Amphiphilic Egg-Derived Carbon Dots: Rapid Plasma Fabrication, Pyrolysis Process, and Multicolor Printing Patterns, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(37), 9297-9301.
- [Wang, 2013] Wang, J., Sahu, S., Sonkar, S.K., Tackett II, K.N., Sun, K.W., Liu, Y., Maimaiti, H., Anilkumar, P., Sun, Y.P., Versatility with carbon dots - from overcooked BBQ to brightly fluorescent agents and photocatalysts, *RSC Advances*, 2013, 3(36), 15604-15607.
- [Wang, 2015a] Wang, B., Tang, W., Lu, H., Huang, Z., Hydrothermal synthesis of ionic liquid-capped carbon quantum dots with high thermal stability and anion responsiveness, *Journal of Materials Science*, 2015, 50(16), 5411-5418.
- [Wang, 2015b] Wang, J., Su, S., Wei, J., Bahgi, R., Hope-Weeks, L., Qiu, J., Wang, S., Ratio-metric sensor to detect riboflavin via fluorescence resonance energy transfer with ultrahigh sensitivity, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2015, 72, 17-24.

- [Wang, 2015c] Wang, J., Wei, J., Su, S., Qiu, J., Novel fluorescence resonance energy transfer optical sensors for vitamin B12 detection using thermally reduced carbon dots, *New Journal of Chemistry*, 2015, 39(1), 501-507.
- [Wang, 2015d] Wang, Z., Liao, H., Wu, H., Wang, B., Zhao, H., Tan, M., Fluorescent carbon dots from beer for breast cancer cell imaging and drug delivery, *Analytical Methods*, 2015, 7(20), 8911-8917.
- [Wang, 2016] Wang, L., Liu, S., Hao, C., Zhang, X., Wang, C., He, Y., A dual-fluorescence biosensor assembled by quantum dots and phenazinium dyes: A comparative study for DNA detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 229, 145-154.
- [Wang, 2017] Wang, Y., Sauriat-Dorizon, H., Korri-Youssoufi, H., Direct electrochemical DNA biosensor based on reduced graphene oxide and metalloporphyrin nanocomposite, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 251, 40-48.
- [Waring, 1965] Waring, M.J., Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *Journal of Molecular Biology*, 1965, 13(1), 269-282.
- [Watkins, 1975] Watkins, B.F., Behling, J.R., Kariv, E., Miller, L.L., Chiral electrode, *Journal of the American Chemical Society*, 1975, 97(12), 3549-3550.
- [Wavhal, 2002] Wavhal, D.S., Fisher, E.R., Hydrophilic modification of polyethersulfone membranes by low temperature plasma-induced graft polymerization, *Journal of Membrane Science*, 2002, 209(1), 255-269.
- [Wayu, 2017] Wayu, M.B., Schwarzmann, M.A., Gillespie, S.D., Leopold, M.C., Enzyme-free uric acid electrochemical sensors using  $\beta$ -cyclodextrin-modified carboxylic acid-functionalized carbon nanotubes, *Journal of Materials Science*, 2017, 52(10), 6050-6062.
- [Welch, 2005] Welch, C.M., Banks, C.E., Simm, A.O., Compton, R.G., Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(1), 12-21.
- [Whitsitt, 2003] Whitsitt, E.A., Barron, A.R., Silica Coated Single Walled Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, 2003, 3(6), 775-778.
- [Wilentz, 1998] Wilentz, R.E., Chung, C.H., Sturm, P.D.J., Musler, A., Sohn, T.A., Offerhaus, G.J.A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., Slebos, R.J.C., K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma, *Cancer*, 1998, 82(1), 96-103.
- [Williams, 2009] Williams, G., Kamat, P.V., Graphene-Semiconductor Nanocomposites: Excited-State Interactions between ZnO Nanoparticles and Graphene Oxide, *Langmuir*, 2009, 25(24), 13869-13873.
- [Wood, 1999] Wood, R., How to validate analytical methods, *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18(9-10), 624-632.
- [Wu, 2007] Wu, J., Pisula, W., Müllen, K., Graphenes as Potential Material for Electronics, *Chemical Reviews*, 2007, 107(3), 718-747.
- [Wu, 2009] Wu, Z.S., Ren, W., Gao, L., Zhao, J., Chen, Z., Liu, B., Tang, D., Yu, B., Jiang, C., Cheng, H.M., Synthesis of Graphene Sheets with High Electrical Conductivity and Good Thermal Stability by Hydrogen Arc Discharge Exfoliation, *ACS Nano*, 2009, 3(2), 411-417.
- [Wu, 2013] Wu, Z.L., Zhang, P., Gao, M.X., Liu, C.F., Wang, W., Leng, F., Huang, C.Z., One-pot hydrothermal synthesis of highly luminescent nitrogen-doped amphoteric carbon dots for bioimaging from *Bombyx mori* silk - natural proteins, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(22), 2868-2873.

- [Xia, 2016] Xia, Z., Leonardi, F., Gobbi, M., Liu, Y., Bellani, V., Liscio, A., Kovtun, A., Li, R., Feng, X., Orgiu, E., Samori, P., Treossi, E., Palermo, V., Electrochemical Functionalization of Graphene at the Nanoscale with Self-Assembling Diazonium Salts, *ACS Nano*, 2016, 10(7), 7125-7134.
- [Xiong, 2014] Xiong, W., Qu, Q., Liu, S., Self-assembly of ultra-small gold nanoparticles on an indium tin oxide electrode for the enzyme-free detection of hydrogen peroxide, *Microchimica Acta*, 2014, 181(9), 983-989.
- [Xu, 2004] Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H.J., Gearheart, L., Raker, K., Scrivens, W.A., Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(40), 12736-12737.
- [Xu, 2008] Xu, Y., Bai, H., Lu, G., Li, C., Shi, G., Flexible Graphene Films via the Filtration of Water-Soluble Noncovalent Functionalized Graphene Sheets, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(18), 5856-5857.
- [Xu, 2014] Xu, Z.Q., Yang, L.Y., Fan, X.Y., Jin, J.C., Mei, J., Peng, W., Jiang, F.L., Xiao, Q., Liu, Y., Low temperature synthesis of highly stable phosphate functionalized two color carbon nanodots and their application in cell imaging, *Carbon*, 2014, 66, 351-360.
- [Xu, 2015] Xu, J., Zhou, Y., Cheng, G., Dong, M., Liu, S., Huang, C., Carbon dots as a luminescence sensor for ultrasensitive detection of phosphate and their bioimaging properties, *Luminescence*, 2015, 30(4), 411-415.
- [Xue, 2011] Xue, W., Lin, Z., Chen, H., Lu, C., Lin, J.M., Enhancement of Ultraweak Chemiluminescence from Reaction of Hydrogen Peroxide and Bisulfite by Water-Soluble Carbon Nanodots, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011, 115(44), 21707-21714.
- [Yamada, 2003] Yamada, K., Asazawa, K., Yasuda, K., Ioroi, T., Tanaka, H., Miyazaki, Y., Kobayashi, T., Investigation of PEM type direct hydrazine fuel cell, *Journal of Power Sources*, 2003, 115(2), 236-242.
- [Yamada, 2010] Yamada, Y., Fukunishi, Y., Yamazaki, S.I., Fukuzumi, S., Hydrogen peroxide as sustainable fuel: electrocatalysts for production with a solar cell and decomposition with a fuel cell, *Chemical Communications*, 2010, 46(39), 7334-7336.
- [Yamashita, 2002] Yamashita, K., Takagi, M., Kondo, H., Takenaka, S., Electrochemical Detection of Nucleic Base Mismatches with Ferrocenyl Naphthalene Diimide, *Analytical Biochemistry*, 2002, 306(2), 188-196.
- [Yang, 2009] Yang, S.T., Cao, L., Luo, P.G., Lu, F., Wang, X., Wang, H., Meziani, M.J., Liu, Y., Qi, G., Sun, Y.P., Carbon Dots for Optical Imaging in Vivo, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(32), 11308-11309.
- [Yang, 2011] Yang, Z.C., Wang, M., Yong, A.M., Wong, S.Y., Zhang, X.H., Tan, H., Chang, A.Y., Li, X., Wang, J., Intrinsically fluorescent carbon dots with tunable emission derived from hydrothermal treatment of glucose in the presence of monopotassium phosphate, *Chemical Communications*, 2011, 47(42), 11615-11617.
- [Yang, 2012a] Yang, H.W., Kim, D.C., Yoo, S.H., Park, S., Kang, D.J., Constructing LBL-assembled functional bio-architecture using gold nanorods for lactate detection, *Materials Research Bulletin*, 2012, 47(10), 3056-3060.
- [Yang, 2012b] Yang, G., Chen, F., Yang, Z., Electrocatalytic Oxidation of Hydrogen Peroxide Based on the Shuttlelike Nano-CuO-Modified Electrode, *International Journal of Electrochemistry*, 2012, 2012, Article ID 194183.

- [Yang, 2013] Yang, Y., Wu, D., Han, S., Hu, P., Liu, R., Bottom-up fabrication of photoluminescent carbon dots with uniform morphology via a soft-hard template approach, *Chemical Communications*, 2013, 49(43), 4920-4922.
- [Yeh, 2012] Yeh, Y.C., Creran, B., Rotello, V.M., Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology, *Nanoscale*, 2012, 4(6), 1871-1880.
- [Yu, 1998] Yu, R., Chen, L., Liu, Q., Lin, J., Tan, K.L., Ng, S.C., Chan, H.S.O., Xu, G.Q., Hor, T.S.A., Platinum Deposition on Carbon Nanotubes via Chemical Modification, *Chemistry of Materials*, 1998, 10(3), 718-722.
- [Yu, 2007] Yu, J., Grossiord, N., Koning, C.E., Loos, J., Controlling the dispersion of multi-wall carbon nanotubes in aqueous surfactant solution, *Carbon*, 2007, 45(3), 618-623.
- [Yu, 2013] Yu, Y., Yang, Y., Gu, H., Zhou, T., Shi, G., Size-tunable Pt nanoparticles assembled on functionalized ordered mesoporous carbon for the simultaneous and on-line detection of glucose and L-lactate in brain microdialysate, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41, 511-518.
- [Yuan, 2011] Yuan, J., Chen, J., Wu, X., Fang, K., Niu, L., A NADH biosensor based on diphenylalanine peptide/carbon nanotube nanocomposite, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2011, 656(1-2), 120-124.
- [Yuan, 2013] Yuan, L., Tian, T., Chen, Y., Yan, S., Xing, X., Zhang, Z., Zhai, Q., Xu, L., Wang, S., Weng, X., Yuan, B., Feng, Y., Zhou, X., Existence of G-quadruplex structures in promoter region of oncogenes confirmed by G-quadruplex DNA cross-linking strategy, *Scientific Reports*, 2013, 3, Article ID 01811.
- [Zaluzhna, 2012] Zaluzhna, O., Li, Y., Zangmeister, C., Allison, T.C., Tong, Y.Y.J., Mechanistic insights on one-phase vs. two-phase Brust-Schiffrin method synthesis of Au nanoparticles with dioctyl-diselenides, *Chemical Communications*, 2012, 48(3), 362-364.
- [Zhang, 1996] Zhang, J., Tse, Y.H., Pietro, W.J., Lever, A.B.P., Electrocatalytic activity of N,N',N'',N'''-tetramethyl-tetra-3,4-pyridodiporphyrzinocobalt(II) adsorbed on a graphite electrode towards the oxidation of hydrazine and hydroxylamine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996, 406(1), 203-211.
- [Zhang, 2006] Zhang, M., Su, L., Mao, L., Surfactant functionalization of carbon nanotubes (CNTs) for layer-by-layer assembling of CNT multi-layer films and fabrication of gold nanoparticle/CNT nanohybrid, *Carbon*, 2006, 44(2), 276-283.
- [Zhang, 2010] Zhang, Y., Guo, L., Wei, S., He, Y., Xia, H., Chen, Q., Sun, H.B., Xiao, F.S., Direct imprinting of microcircuits on graphene oxides film by femtosecond laser reduction, *Nano Today*, 2010, 5(1), 15-20.
- [Zhang, 2013] Zhang, X., Wang, S., Zhu, C., Liu, M., Ji, Y., Feng, L., Tao, L., Wei, Y., Carbon-dots derived from nanodiamond: Photoluminescence tunable nanoparticles for cell imaging, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2013, 397, 39-44.
- [Zhang, 2015] Zhang, J., Yuan, Y., Liang, G., Yu, S.H., Scale-Up Synthesis of Fragrant Nitrogen-Doped Carbon Dots from Bee Pollens for Bioimaging and Catalysis, *Advanced Science*, 2015, 2(4), 1500002.
- [Zhang, 2016] Zhang, Y., Wei, Q., The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, 781, 401-409.
- [Zhao, 2008] Zhao, Q.L., Zhang, Z.L., Huang, B.H., Peng, J., Zhang, M., Pang, D.W., Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite, *Chemical Communications*, 2008, 5116-5118.

- [Zhao, 2009] Zhao, Y.L., Stoddart, J.F., Noncovalent Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes, *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42(8), 1161-1171.
- [Zhao, 2010] Zhao, J., Pei, S., Ren, W., Gao, L., Cheng, H.M., Efficient Preparation of Large-Area Graphene Oxide Sheets for Transparent Conductive Films, *ACS Nano*, 2010, 4(9), 5245-5252.
- [Zheng, 2009] Zheng, L., Chi, Y., Dong, Y., Lin, J., Wang, B., Electrochemiluminescence of Water-Soluble Carbon Nanocrystals Released Electrochemically from Graphite, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(13), 4564-4565.
- [Zheng, 2014] Zheng, J., Chen, C., Wang, X., Zhang, F., He, P., A sequence-specific DNA sensor for Hepatitis B virus diagnostics based on the host-guest recognition, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 199, 168-174.
- [Zhou, 2006] Zhou, N., Wang, J., Chen, T., Yu, Z., Li, G., Enlargement of Gold Nanoparticles on the Surface of a Self-Assembled Monolayer Modified Electrode: A Mode in Biosensor Design, *Analytical Chemistry*, 2006, 78(14), 5227-5230.
- [Zhou, 2008] Zhou, H., Liu, N., Gao, Z., Wang, H., Fang, Y., A novel one-step method to incorporate ss DNA into bilayer lipid membranes supported on an agar electrode, *Electrochemistry Communications*, 2008, 10(5), 787-790.
- [Zhou, 2009a] Zhou, M., Wang, Y., Zhai, Y., Zhai, J., Ren, W., Wang, F., Dong, S., Controlled Synthesis of Large-Area and Patterned Electrochemically Reduced Graphene Oxide Films, *Chemistry - A European Journal*, 2009, 15(25), 6116-6120.
- [Zhou, 2009b] Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., Beattie, D.A., Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 331(2), 251-262.
- [Zhou, 2011] Zhou, X., Zhang, J., Wu, H., Yang, H., Zhang, J., Guo, S., Reducing Graphene Oxide via Hydroxylamine: A Simple and Efficient Route to Graphene, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011, 115(24), 11957-11961.
- [Zhu, 2003] Zhu, N., Zhang, A., He, P., Fang, Y., Cadmium sulfide nanocluster-based electrochemical stripping detection of DNA hybridization, *Analyst*, 2003, 128(3), 260-264.
- [Zhu, 2009] Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., Yang, X., Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties, *Chemical Communications*, 2009, 5118-5120.
- [Zhu, 2010] Zhu, Y., Murali, S., Stoller, M.D., Velamakanni, A., Piner, R.D., Ruoff, R.S., Microwave assisted exfoliation and reduction of graphite oxide for ultracapacitors, *Carbon*, 2010, 48(7), 2118-2122.
- [Zhu, 2012] Zhu, C., Zhai, J., Dong, S., Bifunctional fluorescent carbon nanodots: green synthesis via soy milk and application as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction, *Chemical Communications*, 2012, 48(75), 9367-9369.
- [Zou, 2015] Zou, H.L., Li, B.L., Luo, H.Q., Li, N.B., A novel electrochemical biosensor based on hemin functionalized graphene oxide sheets for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 207, 535-541.
- [Zuo, 2015] Zuo, J., Jiang, T., Zhao, X., Xiong, X., Xiao, S., Zhu, Z., Preparation and Application of Fluorescent Carbon Dots, *Journal of Nanomaterials*, 2015, 2015, Article ID 787862.

Publicaciones

---





La presente tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Bravo, I., García-Mendiola, T., Revenga-Parra, M., Pariente, F., Lorenzo, E., Diazonium salt click chemistry based multiwall carbon nanotube electrocatalytic platforms, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 211, 559-568, doi: 10.1016/j.snb.2015.01.076.
- Abad, J.M., Bravo, I., Pariente, F., Lorenzo, E., Multi-tasking Schiff base ligand: a new concept of AuNPs synthesis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408, 2329-2338, doi: 10.1007/s00216-016-9329-y.
- Bravo, I., Revenga-Parra, M., Pariente, F., Lorenzo, E., Reagent-less and robust biosensor for direct determination of lactate in real samples, *Sensors*, 2017, 17, 144, doi: 10.3390/s17010144.
- García-Mendiola, T., Bravo, I., López-Moreno, J.M., Pariente, F., Wannemacher, R., Weber, K., Popp, J., Lorenzo, E., Carbon nanodots based biosensors for gene mutation detection, *Sensors and Actuators B: Chemical* (enviado).